

**Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales**

Universidad Nacional de La Plata.



Instituto de Fisiología Vegetal, INFIVE, CONICET-UNLP

**Eficiencia en el uso y adquisición de fósforo en plantas  
de maíz y soja: participación del óxido nítrico**

Tesis para optar por el título de Doctor

Ing. Agrónomo Facundo Antonio Ramos Artuso

Directora: Marcela Simontacchi

Co-directora: Andrea Galatro

2018

## Los trabajos realizados durante la elaboración de esta tesis fueron parcialmente Incluidos en:

- Key Acclimation Responses to Phosphorus Deficiency in Maize Plants are Influenced by Exogenous Nitric Oxide. F. Ramos Artuso, A. Galatro, A. Buet, G.E. Santa-María, M. Simontacchi. *Journal of Plant Physiology*, (2018) 222: 51-58
- Early events following phosphorus restriction involve changes in proteome and affects nitric oxide metabolism in soybean leaves. Enviado a *Environmental and Experimental Botany*. Ref: EEB\_2018\_1216. En revisión.

Además, durante el período de realización de mi Doctorado, participé en:

### 1. Revisiones:

- Plant Survival in a Changing Environment: Nitric Oxide as a Cue to Cope with Abiotic Stress. M. Simontacchi, A. Galatro, F. Ramos Artuso, G. E. Santa María. *Frontiers in Plant Science*, (2015) Vol 6, art. 977
- The complexity of nitric oxide generation and function in plants. *Biocell*, 2016, 40: 1-M.P. Benavides, S.M. Gallego, F. Ramos Artuso, M. Checovich, A. Galatro.

### 2. Resúmenes publicados:

- Generación y efecto de óxido nítrico en condiciones de suministro restringido de fosfato. F. Ramos Artuso, A. Galatro, M. Simontacchi. ISBN 978-987-544-592-5 (e-book) 978-987-544-591-8 (papel). XV Congreso Latinoamericano XXX Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Mar del Plata, Argentina 21-24 septiembre de 2014
- Eficiencia en el uso y adquisición de fósforo en plantas cultivadas: participación del óxido nítrico. Facundo Ramos Artuso, Andrea Galatro, Marcela Simontacchi. Vol. 2, Núm. 1 (2015) Revista Investigación Joven ISSN: 2314-3991
- Phosphorus deficiency in soybean plants. A. Galatro, F. Ramos Artuso, A. Lima, C. Batthyany Dighiero, G.E. Santa María, M. Simontacchi. LI Reunión Anual Sociedad

Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología. Mar del Plata, Argentina 3-6 de noviembre de 2015. Molecular BioCell 39 (Suppl. 2) 2015, ISSN 0327-9545

- Eventos tempranos subsiguientes a la privación de fósforo involucran cambios en los niveles de óxido nítrico. A. Galatro, F. Ramos Artuso, A. Lima, C. Batthyany Dighiero, G.E. Santa María, M. Simontacchi. XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Corrientes, Argentina, 13-16 de noviembre 2016. ISBN 978-987-3619-17-51

- Efecto del agregado de un dador de óxido nítrico sobre las respuestas del maíz a la deficiencia de fósforo. F. Ramos Artuso, A. Galatro, G.E. Santa María, M. Simontacchi. XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, Corrientes, Argentina, 13-16 de noviembre 2016. ISBN 978-987-3619-17-51

- El óxido nítrico influencia respuestas de aclimatación de plantas de maíz a deficiencia de fósforo. F. Ramos Artuso, A. Galatro, M. Simontacchi. II Jornada de Jóvenes Investigadores, organizado por CISAy, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, 13 de junio de 2017, Revista Investigación Joven Vol 4 (2) pag. 73 (2017)

# Agradecimientos

---

- A mis directoras Marcela Y Andrea, por su vocación, su calidad profesional y humana y por todo lo que me enseñaron con su ejemplo durante estos años con una generosidad sin límite. Me siento muy afortunado de haberlas podido tener como directoras.
- A toda mi familia, especialmente Lu y Joaquina, mis compañeras de todos los días y a mi mama por siempre haber estado.
- A mis amigos y compañeros del INFIVE, tanto becarios como investigadores y CPAs, siempre recibí de ellos necesaria y generosa ayuda y consejo.
- A mi querida Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, mi segundo hogar y al INFIVE por haberme abierto sus puertas para realizar este trabajo, y al CONICET por financiarlo.
- A todos aquellos/as que en algún momento lucharon o luchan por construir y defender la educación y la ciencia públicas.

# Resumen

---

El fósforo (P) es un macronutriente con funciones regulatorias y estructurales, esencial para la transferencia de energía. Bajo condiciones de escasa disponibilidad de este nutriente, las plantas responden ajustando sus caminos metabólicos a fin de reorganizar sus prioridades fisiológicas. Mejorar la adquisición y la utilización de P en cultivos es de gran interés para mantener un buen estado nutricional en las plantas y maximizar la producción de biomasa minimizando la adición de fertilizantes y el consecuente riesgo de eutroficación.

El óxido nítrico (NO) participa en la modulación y señalización de un amplio rango de funciones en las plantas, incluyendo las respuestas de aclimatación a estrés biótico y abiótico. Si bien las fuentes de generación del NO en plantas todavía no han sido completamente caracterizadas, es claro que los niveles de esta especie varían en los tejidos de acuerdo a señales fisiológicas y del ambiente, y que también el NO generado en el ambiente puede difundir a los tejidos de las plantas y ejercer efectos biológicos.

Con un foco en los niveles de NO como posible componente en la percepción y señalización de las plantas enfrentando deficiencias nutricionales, se avanzó en la caracterización del rol desempeñado por esta especie en algunas respuestas clásicas de las plantas de maíz al déficit de P (Capítulo 4.1) y en los cambios fisiológicos y metabólicos tempranos desencadenados en plantas de soja frente a las primeras horas de restricción de P (Capítulo 4.2). Algunas de las respuestas tempranas a la restricción de P fueron evaluadas comparativamente en soja y maíz teniendo en cuenta sus diferencias metabólicas (metabolismo C3 o C4) (Capítulo 4.3).

Las plantas de maíz (*Zea mays*, híbrido Ax882 CI-MG) fueron expuestas a cuatro tratamientos que combinaron dos niveles de P (0 y 0,5 mM), y dos niveles de un dador de NO, el S-nitrosoglutatión (GSNO, 0 y 0,1 mM) y se estudiaron a distintos tiempos, 6 y 21 días, las respuestas a la privación de P. Estos tiempos fueron seleccionados teniendo en cuenta que: 1) bajo las condiciones experimentales desarrolladas en este trabajo de tesis luego de 21 días de tratamiento los efectos de la deficiencia de P resultaban claramente observables en las plantas, y 2) trabajos previos que describieron respuestas fisiológicas al déficit de P cuando las plantas presentaban un 20% de restricción del crecimiento, que en nuestro sistema experimental coincidió con el día 6 de

tratamiento. Los tratamientos con GSNO sobre las plantas restringidas en P, no afectaron significativamente la acumulación de P, la distribución de biomasa, el contenido de antocianinas y el *filocrono*, pero provocaron una reducción en la eficiencia de utilización del P (EPU) en la planta entera luego de 21 días de tratamiento. La adición de GSNO a la solución nutritiva ayudó a mantener los valores de clorofila en hojas de plantas expuestas a déficit de P pero no pudo revertir la caída del rendimiento cuántico del fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) probablemente debido a la inhibición de mecanismos del proceso fotosintético posteriores a la excitación lumínica de la clorofila, afectados por la baja disponibilidad de P. Luego de 21 días de tratamiento, la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en raíz no se vio afectada significativamente por el déficit de P, sin embargo, la actividad ascorbato peroxidasa (APX) se incrementó durante el mismo. El tratamiento con GSNO incrementó la actividad APX tanto en las plantas control como en las plantas sometidas a déficit de P, mientras que la actividad SOD fue significativamente reducida en ambas condiciones debido al tratamiento. La actividad de las enzimas fosfatasa ácida en la raíz se incrementó como consecuencia de la restricción de P, y resultó fuertemente influenciada por la presencia del dador de NO, que generó un incremento de la actividad únicamente bajo condiciones de déficit de P. Las plantas de maíz expuestas durante 6 días a restricción de P generaron una fuerte caída en el pH de la solución nutritiva y un incremento en la capacidad de captar P del medio externo. La caída del pH en el medio de cultivo resultó incrementada de forma significativa en presencia del dador de NO, lo cual podría estar relacionado con mecanismos dependientes de esta especie que incrementan la extrusión de protones y/o ácidos orgánicos. El tratamiento con el dador de NO también generó un incremento sobre la capacidad de captación de P desde el medio externo en las plantas provenientes de una situación de déficit del mismo. Futuros estudios permitirán profundizar en torno a los mecanismos moleculares que relacionan al NO con estas respuestas claves de aclimatación a la deficiencia de P.

Plantas de soja (*Glycinemax*, cv Williams 82), fueron sometidas a tratamientos de restricción total de P durante 15, 24 y 48 h. Se utilizó una aproximación *Shotgun* para evaluar los cambios en el proteoma de manera conjunta con la evaluación de otros procesos fisiológicos. Aunque ni los parámetros fotosintéticos ni el crecimiento fueron significativamente afectados, una caída inicial de la concentración total de P de 27% en las hojas unifoliadas luego de 24 h de restricción del nutriente llevaron a cambios en el proteoma y a modificaciones en los niveles de NO sugiriendo la existencia de cambios metabólicos tempranos inducidos durante las primeras horas de déficit. El análisis proteómico dio como resultado un total de 202 proteínas exclusivamente expresadas y

232 proteínas incrementadas en las hojas de plantas expuestas por 24 h a la restricción de P. La clasificación de las proteínas de acuerdo al consorcio *Gene Ontology* por su función molecular o procesos biológicos reveló un mayor porcentaje perteneciente a la categoría de actividad catalítica o procesos metabólicos respectivamente. Los resultados sugieren que el metabolismo se prepara en forma temprana para enfrentar restricciones más severas en la disponibilidad de P, con cambios metabólicos que implican el ahorro de ATP y reciclado de P, la provisión de NADPH para procesos biosintéticos, el incremento en enzimas con capacidad antioxidante, del metabolismo de carbohidratos, e involucradas en metabolismo secundario, como por ejemplo en la síntesis de flavonoides, y en la síntesis de hormonas como el etileno. Los cambios metabólicos relacionados al metabolismo de carbohidratos y destinados a mantener el balance redox en la célula parecen ser claves durante las primeras horas de restricción de P. En relación con el metabolismo del NO, tanto los niveles de esta especie como la actividad NR se vieron incrementados en condiciones de restricción de P. Adicionalmente, una isoforma de la NR fue exclusivamente expresada en las hojas de plantas sometidas a restricción de P. Los niveles de NO pueden ser consecuencia del incremento de la actividad NR, aunque otras fuentes de generación de esta especie no pueden ser descartadas. Además, el incremento en la abundancia relativa de proteínas involucradas en la síntesis de etileno sugiere una posible interacción entre el NO y el metabolismo del etileno en hojas de soja pasadas las primeras 24 h de restricción de P. Aunque los niveles de NO se vieron incrementados bajo condiciones de restricción de P, el patrón de nitración de las proteínas no resultó sustancialmente modificado en las hojas, sugiriendo que esta modificación es un proceso específico y cuidadosamente regulado y cuyo rendimiento se encuentra afectado por multiplicidad de factores. La mayoría de las proteínas nitradas en las hojas de soja presentaron localización cloroplástica, uno de los sitios propuestos de generación de NO y ROS. Sólo una proteína resultó diferencialmente nitrada, la metionina sintasa, siendo el significado funcional de esta modificación *in planta* blanco de futuros estudios. Así, las plantas de soja parecen percibir la baja disponibilidad de P en forma temprana, y los cambios desencadenados sugieren el ajuste de su metabolismo para afrontar condiciones más severas de restricción al nutriente. La actividad NR y la generación de NO podrían ser mecanismos involucrados en la percepción y respuesta temprana al estrés.

En los experimentos comparativos soja-maíz, las plantas crecieron en idénticas condiciones ambientales y fueron sometidas a restricción de P por un período de 24 h. El decaimiento significativo y similar en la concentración de P a tiempos cortos de restricción (24 h) en plantas de

maíz y soja (hoja unifoliada en plantas de soja, hoja 2 en plantas de maíz), no impactó en los parámetros fotosintéticos ( $\Phi_{PSII}$  y concentración de clorofila) ni en otros parámetros fisiológicos como la conductancia estomática, los cuales permanecieron estables para ambas especies. El nivel de NO en las hojas de plantas afectadas por la restricción de P resultó distinto para ambas especies, ya que las hojas unifoliadas de soja (C3), incrementaron significativamente el nivel de NO, mientras que las hojas del maíz (C4) no sólo no lo incrementaron, sino que mostraron una tendencia a disminuir el nivel de esta especie principalmente en la zona de la vaina. Las diferencias observadas para las plantas de maíz y soja coincidieron con los cambios observados en la actividad de la enzima NR permitiendo asumir que el cambio en la concentración de NO se podría deber, al menos en parte, al cambio en la actividad enzimática de la NR. La acumulación de NO en células de la vaina donde la NR está ausente, y en los cloroplastos del mesófilo en las plantas de maíz arroja interrogantes interesantes en torno a la producción de NO en ambos tipos celulares, ya sea que el NO se produzca en las células del mesófilo y se acumule en las células de la vaina o que alguna otra fuente de generación, diferente a la NR, (por ejemplo dependiente de arginina), pueda ser operativa en estas células. De esta manera es posible proponer que la generación de NO también puede estar diferencialmente localizada las hojas de maíz y que las distintas fuentes puedan verse afectadas ante situaciones de estrés, como ha sido observado previamente que ocurre, por ejemplo, con otras enzimas y antioxidantes. Futuros experimentos en torno a la generación y vías de degradación de NO en ambos tipos de células permitirán obtener una panorámica más clara de las posibles vías de generación de NO involucradas y la variación en los niveles de NO.

***Los resultados obtenidos permiten proponer al NO como modulador de respuestas claves de aclimatación frente a la restricción de P. Los cambios tempranos en los niveles de NO sugieren una participación de esta molécula en la percepción de las modificaciones producidas en el ambiente. Si bien los mecanismos involucrados tanto en la generación de esta especie como en la participación de la misma en la modulación de las respuestas necesitan ser investigados, este trabajo de Tesis ha permitido avanzar en el conocimiento de las funciones del NO en las plantas particularmente sometidas a déficit nutricional de fósforo.***



# Summary

---

Phosphorus (P) is a macronutrient with structural and regulatory functions, essential for energy transfer. Under limited P availability, plant cells respond adjusting their metabolic pathways in order to reorganize physiological priorities. Improving phosphorus (P) acquisition and utilization in crops is of great importance in order to achieve a good plant nutritional state and maximize biomass production while minimizing the addition of fertilizers, and the concomitant risk of eutrophication.

Nitric oxide (NO) participates in the modulation and signaling of a wide range of functions in plants, including acclimation responses to biotic and abiotic stress. Endogenous sources of NO remain to be fully characterized, however, it is clear that NO levels vary in plant tissues according to environmental and physiological signals, and that NO generated in the environment can diffuse into plant tissues and exert biological effects.

Focusing on NO level as a likely component in sensing and signaling nutritional deficiencies, the role of this molecule in some key responses of maize plants to P deficiency was characterized (Chapter 4.1), and the initial metabolic and physiological changes following P deprivation were estimated in soybean leaves during the first hours of P deprivation (Chapter 4.2). Some early responses to P restriction were evaluated comparatively in soybean and maize plants taking into account metabolic differences (C3 or C4 metabolism) of these species (Chapter 4.3).

Maize plants (*Zea mays* L. Ax882 CI-MG) were exposed to four treatments performed by the combination of two P levels (0 and 0.5 mM), and two GSNO levels (0 and 0.1 mM), and responses to P-deprivation were studied at 6 and 21 days. The times were selected taking into account: 1) under the experimental conditions employed here after 21 days of treatment P deficiency effects on plants were clearly observed, and 2) previous work observed physiological acclimation responses to P deficiency in plants when growth suffered a 20% restriction in P-deprived relative to P-well supplied plants, in our experimental conditions this situation was coincident with the day 6 of treatment. GSNO treatments on P restricted plants did not affect P accumulation and biomass distribution, anthocyanin content, and *filocrono*, but a reduction in P utilization efficiency (EPU) was observed in the whole plant after 21 days of treatment. Although chlorophyll content was kept in some leaves after GSNO addition, GSNO treatment could not revert the fall in the quantum yield of photosystem II ( $\Phi$ PSII), probably due to the inhibition of photosynthetic mechanisms later

to light excitation of chlorophyll, that were affected due to the lack of P in the leaves. After 21 days of treatments, superoxide dismutase (SOD) activity was not significantly affected in roots suffering P deficiency; however, ascorbate peroxidase (APX) activity was increased. GSNO treatment also increased APX activity in control and P deprived plants, but SOD activity was significantly decreased in both conditions due to the treatment. Acid phosphatases activity in roots was increased as a consequence of P restriction, and was influenced but the presence of the NO donor, that provoked an increment in the activity just under P restriction. Maize plants exposed for 6 days to P restriction showed a high capacity to perform external medium acidification and P uptake as compared to plants with full nutrition. The ability to decrease the external pH was further increased in those plants that had been grown in the presence of the NO donor. This effect may be related with specific NO-dependent mechanisms leading to proton extrusion and/or a rapid release of organic substances. When the P-uptake ability was evaluated in plants that had been grown simultaneously in the absence of P and in the presence of the NO donor, a higher P-depletion capacity from the external media was observed. Further studies will lead to the understanding about the molecular mechanisms that involve NO with these key acclimation responses to P restriction.

Soybean plants (*Glycine max*, cv Williams 82), were exposed to total P restriction for 15, 24 and 48 h. *Shotgun* proteomic analyses were employed to evaluate changes in the proteome together with other physiological processes. Although neither growth nor photosynthesis was strongly affected, an initial fall in total P concentration (27%) in the first unifoliate leaves following P deprivation revealed changes in proteome and NO levels, suggesting that metabolic changes were induced during the first hours of P deprivation. *Shotgun* proteomic analyses of leaves from plants exposed to P-deprivation for 24 h showed a total of 202 proteins exclusively detected and 232 proteins increased in their relative abundance under -P conditions. The proteins affected belong mainly to the catalytic activity or biological processes groups according to Gene Ontology Consortium. Results suggest that metabolism is being prepared to face a deeper decrease in P levels, with metabolic changes leading to: preserve ATP and recycling P, provide NADPH to biosynthetic processes, increase the antioxidant enzyme, and enzymes from carbohydrate metabolism or secondary metabolism, such as related to flavonoid and hormone synthesis (e.g. ethylene). Metabolic changes related to carbohydrate metabolism and to maintain redox balance in the cell seem to be important during the first hours of P deprivation. Higher levels of the bioactive molecule nitric oxide were accompanied with a parallel increase in NR activity under P restriction.

Additionally an isoform of NR was exclusively detected in leaves from P restricted plants. Even though the increase in NO level may be a consequence of NR activity, other sources of NO generation could not be discarded. In addition, the increase in the relative abundance of proteins involved in ethylene synthesis, suggests a possible interaction between the NO and ethylene metabolism in soybean leaves during the first 24 hours of P restriction. Despite the increase in NO level under P restriction, the pattern of protein nitration was not substantially modified in the leaves, suggesting that this modification is a tightly regulated and specific process. In fact, biological nitration yield is affected by a multiplicity of processes. The majority of nitrated proteins had a chloroplastic localization in coincidence with a site proposed for NO synthesis and ROS production. Only one protein was differentially nitrated in soybean leaves, the methionine synthase, and the functional significance of this protein modification *in planta* will require extensive study. Soybean leaves seem to sense low P availability very early and the proteomic changes triggered suggest the adjustment of their metabolism to further P scarcity. NR activity and NO generation may be mechanisms involved in sensing P levels in the cell and triggering early stress responses.

In the comparative experiments developed employing soybean and maize plants, both plants were grown under the same conditions and exposed to P restriction treatment for 24 h. The decrease in P concentration in the leaves (first unifoliate soybean leaves, and second leaves in maize plants) did not affect photosynthesis ( $\Phi$ PSII, and chlorophyll content) and other physiological parameters such as stomatic conductance, that remained stable in both plants. The levels of NO in the leaves were different in soybean (C3) and maize (C4) plants, where the unifoliate soybean leaves showed higher NO level, whereas maize leaves tended to decrease these levels mainly in the zone of bundle sheath cells. These differences were in agreement with the change in the NR activity, suggesting that NR may be one of the ways involved in NO generation. NO accumulation in the zone of bundle sheath cells lead to the question about NO production in both types of maize cells. NO may be produced in mesophyll cells and then accumulated in the bundle sheath cells, or other NO generation sources, different from NR (e.g. arginine dependent) operative in these cells. Thus, it is possible that NO generation could be differentially localized in maize leaves, and that the different sources of NO production may be affected under stress conditions, such as it was previously observed with other antioxidants enzymes. Further experiments related to NO generation and degradation in both types of maize cells will help to clarify the observed NO levels.

*Overall the results suggest that key acclimation responses to P-restriction are influenced by NO. Early changes in the NO levels suggest a role of this molecule in the sense of environmental changes. Although both, the mechanisms involved in the NO generation, and the contribution of NO in these responses need further research, this work provided an advance regarding the function of this small molecule in plants specially during nutritional stress, such as P-scarcity.*

# Índice de contenidos

---

## Antecedentes

1.1	El maíz y la soja como cultivos en Argentina y el Mundo	18
1.2	La importancia del fósforo en el marco de la agricultura	18
1.3	La dinámica del fósforo en el suelo	21
1.4	Funciones y dinámica del fósforo en la planta	25
1.4.1	Cambios morfológicos en la raíz	27
1.4.2	Cambios fisiológicos en la planta	28
1.4.3	Exudados radicales	28
1.5	El óxido nítrico en las plantas	29
1.5.1	Síntesis de NO	31
1.5.2	Mecanismos de acción del NO	33
1.5.3	El óxido nítrico y las respuestas al stress	34
1.5.4	Interacción del óxido nítrico y el P en el metabolismo vegetal	35

## Objetivos e Hipótesis

2.1	Hipótesis general	39
2.2	Objetivos específicos	39

## Materiales y métodos

3.1	Material biológico, Condiciones de cultivo y tratamientos	42
3.2	Síntesis del dador de NO y cuantificación de la liberación de NO	46
3.3	Medición de parámetros morfológicos y fenológicos	48
3.4	Determinación de parámetros fotosintéticos	48
3.5	Determinación del contenido de antocianinas	49
3.6	Determinación de intercambio gaseoso	50
3.7	Determinación del contenido de P	50
3.7.1	Determinación de contenido de P en tejidos vegetales	50
3.7.2	Determinación del contenido de P en las soluciones nutritivas	50
3.8	Estimación de índices de eficiencia en el uso del P	51
3.9	Determinación de la capacidad instantánea de absorción de P por las raíces	51

3.10	Medición del pH en la solución nutritiva	52
3.11	Determinaciones enzimáticas	52
3.11.1	Determinación la actividad de fosfatasas acidas en tejidos	52
3.11.2	Determinación la actividad de enzimas antioxidantes	53
3.11.2.1	Determinación de la actividad ascorbato peroxidasa (APX)	54
3.11.2.2	Determinación de la actividad Superóxido dismutasa(SOD)	54
3.11.3	Determinación de la actividad nitrato reductasa (NR)	54
3.12	Determinación del contenido de NO en tejidos	55
3.13	Determinación especies reactivas del oxígeno (ROS) en tejidos	56
3.14	Microscopia óptica de raíces	56
3.15	Determinación del contenido de proteínas	56
3.16	Estudios de proteómica	57
3.17	Análisis estadístico	59

## Resultados

4.1	Deficiencia de P en plantas de maíz. Efecto de la exposición de las plantas a óxido nítrico (NO)	62
4.1.1	Evaluación del contenido de P en plantas de maíz. Establecimiento y caracterización de la deficiencia de P	62
4.1.2	Evaluación del contenido de NO endógeno	63
4.1.3	Exposición de las plantas de maíz a un dador de NO	65
4.1.3.1	Caracterización de la liberación de NO por el GSNO en condiciones de cultivo	65
4.1.3.2	Efecto de la exposición a NO sobre el crecimiento y el contenido de P	67
4.1.3.3	Efecto de la exposición a NO sobre la eficiencia de utilización del P	70
4.1.3.4	Efecto de la exposición a NO sobre la fotosíntesis	71
4.1.3.5	Efecto de la exposición a NO sobre las actividades enzimáticas antioxidantes	74
4.1.3.6	Efecto de la exposición a NO sobre algunas respuestas típicas de adaptación a la deficiencia de P	75
4.2	Deficiencia de P en plantas de soja. Efectos temprano sobre el proteoma y el metabolismo de óxido nítrico	87
4.2.1	Crecimiento y parámetros fotosintéticos durante la restricción de P	87
4.2.2	Análisis de proteómica	89

4.2.3	Detección de niveles de NO y ROS en hojas bajo restricción de P	98
4.2.4	Actividad Nitrato Reductasa (NR) <i>in vivo</i>	101
4.2.5	Detección de proteínas nitradas	101
4.3	Deficiencia de P en plantas de maíz y soja. Análisis comparativo de las respuestas tempranas a la restricción de P	108
4.3.1	Caracterización del contenido de P durante la restricción del nutriente	108
4.3.2	Fotosíntesis y otros parámetros fisiológicos	111
4.3.3	Efecto de la restricción de P sobre el contenido de NO	112
4.3.4	Efecto de la restricción de P sobre la actividad de la enzima NR	117

## Discusión

5.1	Deficiencia de P en plantas de Maíz. Efecto de la exposición de las plantas a dadores de óxido nítrico	120
5.1.1	Establecimiento y caracterización de la deficiencia de P. Efecto de la adición de GSNO	121
5.1.2	Efecto de la adición de GSNO sobre la clorofila	122
5.1.3	Efecto de la adición de GSNO sobre la actividad de enzimas antioxidantes	123
5.1.4	Efecto de la adición de GSNO sobre la actividad de enzimas fosfatasas acidas	125
5.1.5	Efecto de la adición de GSNO sobre el pH rizosférico	127
5.1.6	Efecto de la adición de GSNO sobre la capacidad de captación de P por las raices	129
5.2	Deficiencia de P en plantas de soja. Efectos tempranos sobre el proteoma y el metabolismo de óxido nítrico	132
5.2.1	La restricción de P genera cambios tempranos en el proteoma sin afectar otros procesos fisiológicos	132
5.2.2	Cambios tempranos en los niveles de NO y la actividad nitrato reductasa	135
5.2.3	Nitración de proteínas en hojas de soja durante las primeras horas de restricción de P	137
5.3	Deficiencia de P en plantas de maíz y soja. Análisis comparativo de las respuestas tempranas a la restricción de P	138
5.3.1	Los cambios en el contenido de P no afectan los parámetros fotosintéticos y fisiológicos durante las primeras horas de restricción	139
5.3.2	Cambios en los niveles de NO frente a la deficiencia de P	140

## **6. Conclusiones**

6.1	Deficiencia de P en plantas de maíz, efectos de la exposición de las planta a NO	147
6.2	Deficiencia de P en plantas de soja. Efectos tempranos sobre el proteoma y el metabolismo del NO	149
6.3	Deficiencia de P en plantas de maíz y soja. Análisis comparativo de las respuestas tempranas a la restricción de P	151

## **7. Referencias**

7.	Referencias bibliográficas	154
----	----------------------------	-----



# Antecedentes

---



## 1.1 El maíz y la soja como cultivos en Argentina y el Mundo

La importancia de un cultivo puede ser evaluada en función de muchos parámetros: su superficie de siembra, su significancia en el PBI del país, su valor nutricional y la inserción del mismo como insumo en cadenas de valor agregado, por poner algunos ejemplos significativos. La soja y el maíz son cultivos que destacan en su importancia evaluada a través de todos esos parámetros.

Según los informes del Panorama Agrícola Semanal (PAS) de la bolsa de cereales de Buenos Aires la superficie sembrada de soja durante la campaña 2017/18 fue de  $18 \cdot 10^6$  ha, y la superficie sembrada de maíz fue de  $5,4 \cdot 10^6$  ha, sobre  $32,3 \cdot 10^6$  ha totales destinadas a cultivos agrícolas extensivos en la misma campaña. La soja ocupa el 55,7% y el maíz el 16,7% de la superficie sembrada, lo que equivale a un volumen de producción de  $41,04 \cdot 10^6$  toneladas de soja y  $38,17 \cdot 10^6$  toneladas de maíz.

Según (Cruzate y Casas, 2009), la extracción de fósforo (P) por tonelada producida de soja y maíz en Argentina es de 5,4 y 2,64 Kg respectivamente, haciendo un total de 206.118 y 108.345 toneladas de P extraído durante la campaña 2017/2018 para ambos cultivos. La magnitud tanto de la producción como del consumo de nutrientes de los cultivos de maíz y soja motoriza su estudio, principalmente porque el P es un elemento de ciclo sedimentario, sin fase atmosférica, cuya extracción se lleva adelante en base a minería. Como en Argentina no hay yacimientos de P, nuestra economía es dependiente de la importación del fertilizante para llevar adelante su producción agrícola.

## 1.2 La importancia del fósforo en el marco de la agricultura

El fósforo es uno de los seis macronutrientes esenciales (N, P, K, Ca, Mg, S) para el crecimiento y desarrollo vegetal y su manejo es fundamental a la hora de definir los rindes y la sustentabilidad de los sistemas productivos.

Alrededor de 17,5 millones de toneladas de P son procesadas cada año desde las minas de roca fosfórica y el 85% de este es utilizado en la fabricación de fertilizantes (Cordell y col., 2009). Se estima que el 30% de los suelos agrícolas del mundo son deficientes en P y requieren ser fertilizados para incrementar sus rendimientos (MacDonald y col., 2011); lo que resulta

equivalente a decir que 5700 millones de hectáreas agrícolas en el mundo no contienen P suficiente para sustentar la producción agrícola en niveles óptimos (Batjes 1997).

La roca fosfórica, fuente de los fertilizantes fosforados, es un recurso natural finito y las reservas conocidas de la misma se estima que se agotarán en pocos cientos de años en función de las tasas de consumo actuales (Baker y col., 2015; Gilbert, 2009). Al carácter finito de las reservas, se suma la contribución de los fertilizantes fosforados a la eutrofización de cuerpos de agua (Kleinman y col., 2011) y la baja eficiencia en la absorción del P aplicado mediante fertilizantes; generando un consenso en relación a la necesidad de mejorar la capacidad de absorción y eficiencia de uso del P por parte de los sistemas agrícolas (Richardson 2009).

El P puede catalogarse como un recurso natural no renovable y de carácter estratégico, comparable con el petróleo, no solo por su importancia para la producción de alimentos, sino también porque un pequeño número de países controlan la mayor parte de las reservas conocidas (Cordell, Drangert, and White 2009).

El uso excesivo de fertilizantes fosforados suele ser común en los países más desarrollados, dando lugar a procesos de lixiviación o arrastre por escorrentía del nutriente desde los suelos hacia los cuerpos de agua, generando procesos de eutrofización con graves consecuencias ambientales y sociales; mientras que en las regiones subdesarrolladas la falta de acceso al fertilizante limita la productividad de los cultivos agudizando la frecuente escasez de alimentos (Baker y col., 2015). Estas afirmaciones evidencian que algunos de los problemas asociados al uso de los fertilizantes son emergentes del entorno socio productivo.

La fertilización en exceso se ha convertido en una práctica común en algunos países debido a la gran reactividad del P que facilita su fijación en formas orgánicas e inorgánicas en el suelo y permite que, de forma típica, solo el 20% del P aplicado en una campaña sea recuperado por ese mismo cultivo (Cordell y White, 2015).

La cantidad de P disponible para los cultivos es menor al contenido total de P existente en el suelo, ya que un porcentaje, que puede superar el 90% del P total, se encuentra fijado en el suelo en formas que no resultan asimilables para la mayoría de las plantas. En este sentido, la fertilización, si bien se lleva adelante con fertilizantes que contienen formas solubles y fácilmente asimilables de P, al entrar en contacto con el suelo, el P soluble tiende a precipitar, adsorberse o incorporarse a moléculas orgánicas, incrementando sistemáticamente el *stock* de formas poco disponibles de P, y no siempre aportando a la mayor disponibilidad para las plantas. Generar conocimientos en torno a la forma en que las plantas se comportan frente al equilibrio dinámico entre las formas de

fosforo disponible e indisponible y la relación con la mecánica de absorción del nutriente, como se pretende hacer en esta tesis, es uno de los flancos desde los cuales abordar esta problemática.

Como alternativa a los fertilizantes convencionales de rápida capacidad de absorción por parte de las plantas, existen formas de aplicar P menos solubles, como la roca fosfórica o abonos orgánicos, que presentan la limitante de no generar efectos rápidos en el incremento de la disponibilidad del nutriente en el suelo y el consecuente impacto sobre el rendimiento, sumado a que son difíciles de conseguir (McNeill y Penfold, 2009). Los abonos que contienen P en formas menos solubles son generalmente más utilizados por agricultores orgánicos o de pequeña escala, y recomendables para suelos donde las potenciales pérdidas por lixiviación del P solubilizado son elevadas (Bolland y Gilkes, 1998). Planificar la disponibilidad del P en el suelo para un cultivo en función de la incorporación del nutriente en formas poco solubles es posible, pero para hacerlo es necesario tener un panorama global del sistema planta-suelo-microorganismos en el marco de una planificación productiva a largo plazo, conociendo y trabajando sobre las mencionadas interacciones (Abbona y col., 2016). Este planteo, hoy en día encuadrable en el paradigma de la agroecología, busca optimizar el sistema productivo a partir del conocimiento y aprovechamiento de los procesos biológicos en el marco de un agroecosistema complejo y sustentable, contrastante con el agroecosistema monocultural, simplificado, predominante en la agricultura actual, cuya planificación productiva rara vez excede en términos temporales a la presente campaña, y donde las herramientas para la toma de las decisiones productivas suelen no exceder el cálculo de un margen bruto.

Para poder hablar de una agricultura sustentable, entendida como aquella que “permite mantener en el tiempo un flujo de bienes y servicios que satisfagan las necesidades socioeconómicas y culturales de la población, dentro de los límites biofísicos que establece el correcto funcionamiento de los sistemas naturales (agroecosistemas) que lo soportan” (Sarandón y col., 2006), es necesario generar un balance de nutrientes que equilibre la extracción generada por las plantas con la incorporación de una cantidad equivalente de P disponible en el suelo. Muchas veces esto no se consigue, dando origen a una extracción neta de P en el suelo (Oehl y col., 2002). En la Argentina desde hace décadas mantenemos un balance negativo del *stock* de P en el suelo (Cruzate y Casas, 2012). La extracción neta de minerales es comparable en algún punto a la actividad minera y vuelve muy complejo el cálculo de los verdaderos costos de producción del cultivo, ya que si se considera el P extraído del suelo como un insumo y se le asigna un valor, algunos cultivos actualmente considerados rentables podrían dejar de serlo.

En el lado opuesto se ubican los suelos que presentan una fertilización fosforada sistemática y no planificada, observada durante décadas en algunos países europeos y en producciones intensivas especialmente bajo cubierta, llevando a una acumulación neta de P en el suelo (McLaughlin y James, 1991).

La limitada disponibilidad global de P, los daños que su incorporación irracional genera al ambiente, en especial a medios acuáticos y su elevado costo, justifican el estudio de la eficiencia con la que las plantas son capaces de absorber y utilizar el nutriente y los mecanismos involucrados en cada instancia de las respuestas implicadas y sus respectivas interacciones con el medio.

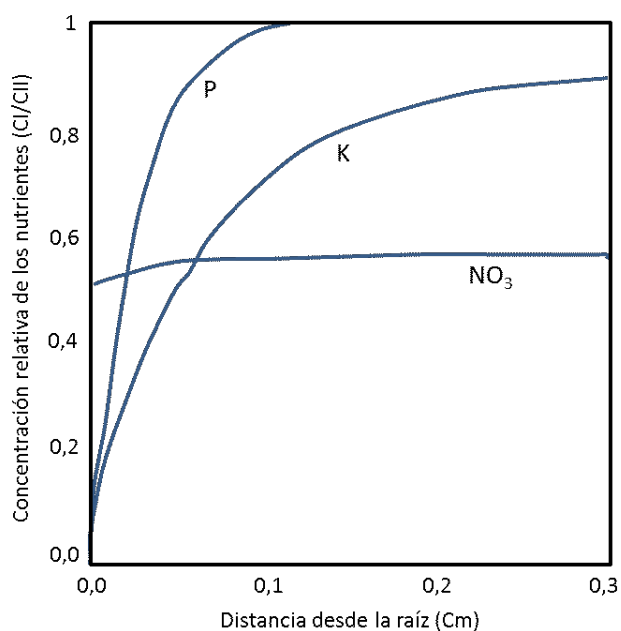
### 1.3 La dinámica del fósforo en el suelo

Como ya se ha dicho, el *stock* de P en el suelo no guarda relación directa ni con la disponibilidad ni con la movilidad del mismo y, en consecuencia, tampoco con la absorción y uso por parte de las plantas, siendo tanto la capacidad de absorción, como la eficiencia de uso, objetivos de gran interés para los científicos que buscan desarrollar cultivos que permitan optimizar el consumo de un insumo no renovable e insustituible (Richardson 2009).

A la hora de caracterizar el contenido de P del suelo es muy importante tener en claro su dinámica, ya que las diferentes formas en que el P se encuentra en el mismo presentan valores biológicos, en relación a la posibilidad de ser incorporados por un ser vivo, muy diferentes entre sí. Por ello, no es recomendable caracterizar el *status* nutricional de un suelo en relación al P mediante un análisis del mismo que solo considere como variable el contenido de P total.

El P es el macronutriente menos móvil y disponible para las plantas en la mayoría de las condiciones edáficas (Hinsinger 2001), y aunque en suelos altamente fertilizados la concentración del nutriente puede ser elevada, en la mayoría de los suelos el P se encuentra en solución en concentraciones entre 2 y 10  $\mu\text{M}$  (Raghothama 1999), muy por debajo del rango óptimo para el crecimiento de las plantas, que según la especie, oscila entre varias decenas y cientos de  $\mu\text{moles}$  por litro (Asher y Lorenagan, 1967; Föhse y col., 1988). La fuerte interacción fisicoquímica del P con el suelo hace que su difusión hacia la superficie de la raíz sea lenta (Fitter y Hay, 2002), lo que da origen a una zona de depleción cercana a la superficie de la raíz, generando un importante gradiente de concentración en pocos milímetros (Figura 1.1 y Figura 1.3). La reducción de la concentración del P en la superficie radical obliga a la planta a utilizar mecanismos de absorción

activos mediante transportadores específicos cuya participación se estima que aporta alrededor del 95% del P en una planta de maíz, mientras que solo el 5% ingresa por flujo masal (Barber 1995). Entendiendo que el P es poco móvil y no migra hacia la raíz, la capacidad de la planta de explorar más volumen de suelo implica entrar en contacto con más P. Aquellas plantas que posean plasticidad en la arquitectura de sus raíces, para hacerlas proliferar hacia los sitios de mayor concentración de P, y con mayor número de raíces superficiales (Lambers y col., 2009), presentarán una mayor eficiencia de absorción.

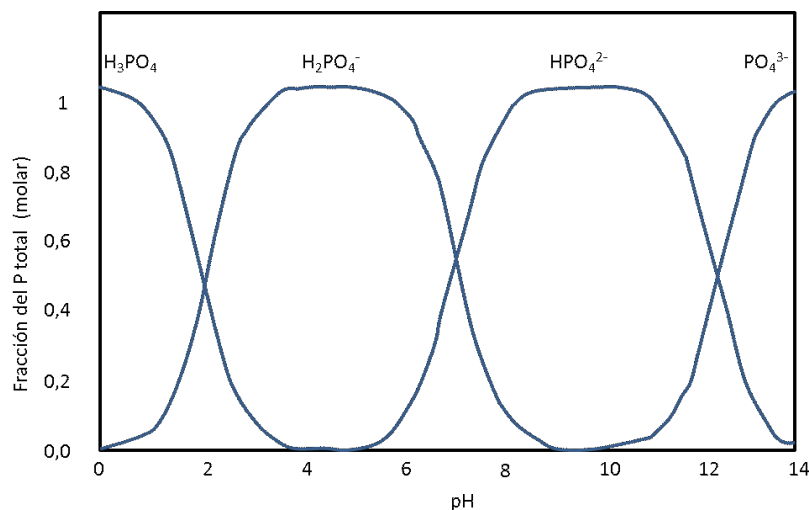


**Figura 1.1.** Depleción de nutrientes en zonas cercanas a la raíz expresada como concentración actual (CI) en relación a la concentración inicial (CII) para tres nutrientes con diferentes dinámicas (P, K y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) en función de la distancia desde la raíz. Adaptada de Darrah (1993).

A fin de analizar la dinámica del P en el suelo es importante comprender la relación existente entre las fracciones orgánicas, las fracciones inorgánicas insolubles y las fracciones inorgánicas solubles. Muchos de los procesos que rigen el pasaje de una a otra de las mencionadas fracciones son aún poco conocidos, pero es sabido que las raíces de las plantas y los microorganismos del suelo catalizan los pasajes de un estado al otro.

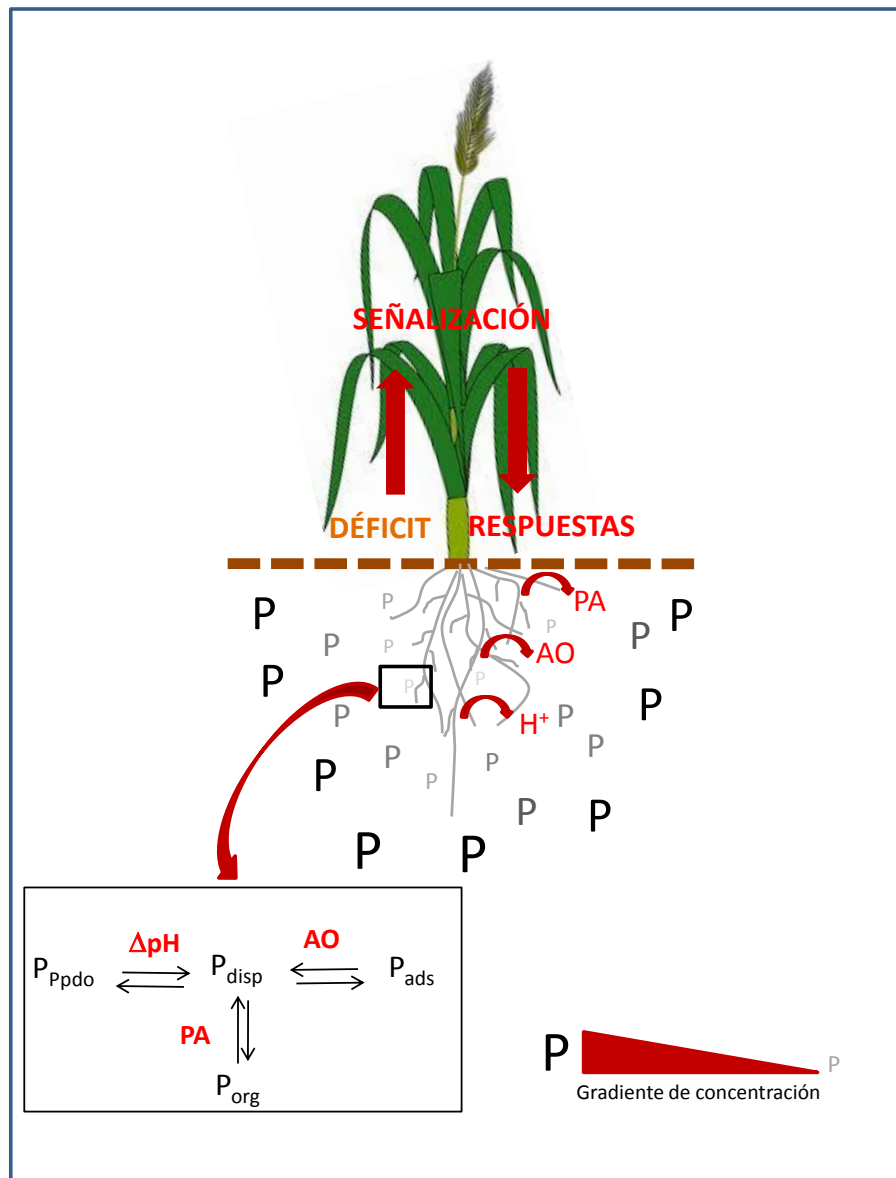
Las plantas absorben el fósforo preferentemente en la forma  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , vía un *simporter*  $\text{H}^+-\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (Taiz y Zeiger, 2002). La absorción del P depende marcadamente del pH; el pH es el principal factor que altera la disponibilidad del P inorgánico en el suelo, ya que la presencia de iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  con pH mayores a 7, y de iones trivalentes de  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Al}^{3+}$  con pH menores a 7, provocan la

precipitación del P en formas insolubles (Lindsay 1980). La forma  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , presenta concentraciones máximas entre pH 4 y 6, encontrándose el  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , como especie predominante en pH menores a 4, y exclusivamente  $\text{HPO}_4^{2-}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  en pH mayores a 6 (Figura 1.2).



**Figura 1.2.** Formas de P presentes en el suelo en función del pH del mismo. Adaptada de (Hinsinger 2001).

Resulta muy difícil predecir, aún mediante modelos matemáticos que consideren múltiples factores, la absorción de P por parte de las raíces, principalmente en condiciones de déficit (Darrah 1993). El déficit nutricional es un fenómeno complejo, que no puede ser relacionado linealmente con la aplicación de una dosis de fertilizante, sino que debe ser comprendida como un fenómeno que involucra numerosos procesos biológicos, geológicos, climáticos, culturales (de manejo) y fisiológicos. Esto implica la necesidad de incorporar a la *nutrición del suelo* como parte de la interpretación holística que debe hacerse para garantizar la *nutrición de la planta/cultivo* en un marco de sustentabilidad.



**Figura 1.3.** Esquema que muestra la dinámica del P en el suelo y algunas respuestas desencadenadas frente al déficit. Inserto: formas de P presentes en el suelo y su interrelación. Abreviaturas: P<sub>ppdo</sub>, P precipitado; P<sub>ads</sub>, P adsorbido; P<sub>disp</sub>, P disponible; P<sub>org</sub>, P orgánico; ΔpH, cambio en el pH del suelo; AO, ácidos orgánicos (ej. citrato, malato); PA, enzimas fosfatasas ácidas. (La figura no representa el gradiente de concentración del nutriente a escala, el mismo se da en pocos milímetros en torno a la raíz).



## 1.4 Funciones y dinámica del fósforo en la planta

El P se encuentra en concentraciones elevadas en los tejidos vegetales (rango milimolar) y tiene un rol crucial dentro del metabolismo energético (ATP), la estructura del ADN, ARN y proteínas, el metabolismo de los hidratos de carbono, las membranas celulares y numerosas funciones de señalización, entre otras (Veneklaas y col., 2012).

Los cultivos tienen diferentes capacidades de solubilizar y asimilar P del suelo, esto se debe, en parte, a que las plantas presentan estrategias de interacción con la rizosfera que les permiten incrementar la captación de P. Entre ellas, podemos mencionar la capacidad de solubilizar el P presente en el suelo mediante la liberación de fosfatasas ácidas, la modificación del pH de la rizosfera, la modificación de la morfología de su raíz (permitiendo una mayor área de exploración con igual biomasa), la exudación de aniones orgánicos o el incremento de la capacidad de absorción activa de P por parte de los transportadores de la superficie de la raíz (Figura 1.3). Además, en muchos casos realizan asociaciones simbióticas con micorrizas que permiten mejorar la exploración (Ramaekers y col., 2010).

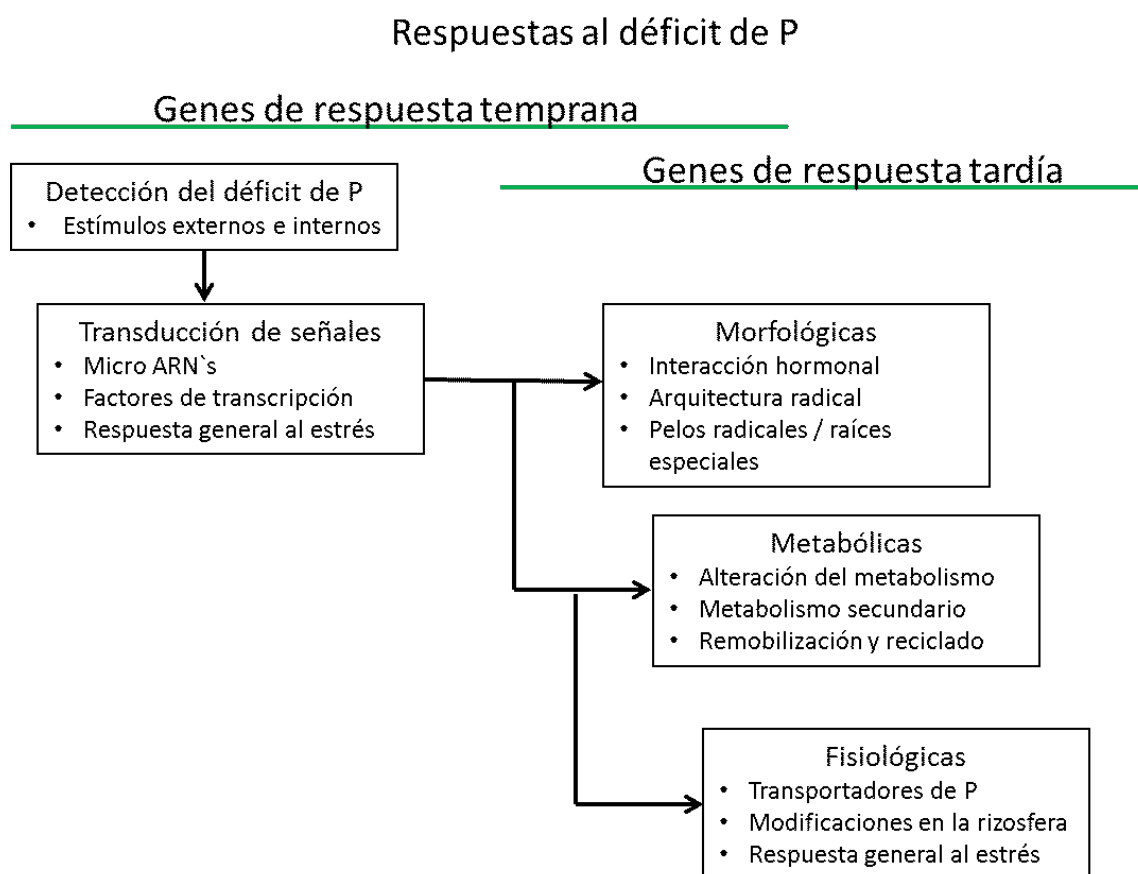
La absorción del P desde el medio a la planta se lleva adelante por medio de un sistema dual compuesto por transportadores de baja afinidad que trabajan en el rango de concentración milimolar, y mediante transportadores de alta afinidad activos en el rango micromolar (Raghothama 1999). En las condiciones típicas de la rizosfera solo son capaces de absorber P los transportadores de alta afinidad ya que la concentración de P es generalmente del orden micromolar (Dong y col., 1999); en este sentido, se ha podido establecer que existe un aumento de la expresión de los transportadores cuando las plantas son sometidas a condición de déficit de P (Smith y col., 2000).

A nivel celular, los niveles de P son estabilizados por removilización entre las reservas acumuladas en las vacuolas y otras organelas, como los cloroplastos donde se sitúa la maquinaria fotosintética (Zhang y col., 2014). Luego de 10 días de iniciado el déficit, el P vacuolar ya se encuentra marcadamente disminuido, mientras que a nivel citoplasmático aún mantiene sus niveles (Lee y col., 1990). A medida que se avanza en investigaciones, se va profundizando en la relación que existe entre la economía del P y otros aspectos de la fisiología. Recientemente se publicó un trabajo donde se relaciona el déficit de P con la capacidad de la planta de desarrollar respuestas inmunes frente al ataque de patógenos, en el cual los autores concluyen que para la planta es

prioritario el mantenimiento de la homeostasis de P para hacer frente a la generación de respuestas inmunes. En situación de déficit de P, estas respuestas se inhiben a través de un mecanismo mediado por los genes de respuesta al déficit de P (PHR1) (Castrillo y col., 2017).

Las respuestas de las plantas al déficit de P se inician en la expresión génica, y estas se suelen clasificar según su velocidad y especificidad en: 1) mediadas por genes tempranos, que generalmente tienen un carácter más inespecífico, y 2) respuestas mediadas por genes tardíos, de mayor especificidad y con impacto sobre la morfología, fisiología y/o metabolismo en situaciones de estrés prolongado (Hammond y col., 2004)(Figura 1.4).

El orden temporal en el cual las respuestas al déficit de P se hacen presentes varía en función de la magnitud del déficit y del momento ontogénico en que el mismo se hace presente. Sin embargo, existe un orden medianamente descrito desde la genómica (Hammond y col., 2004).



**Figura 1.4.** Esquema que muestra el orden de aparición de los diferentes tipos de respuestas a partir del establecimiento de una situación de déficit nutricional. Adaptada de Richardson (2009).

En relación al origen de las respuestas, se propone que las respuestas sistémicas, como la activación de transportadores, la remodelación de las membranas lipídicas, así como la represión de la fotosíntesis y la fotorrespiración, se desencadenan a partir del censado de niveles de P intracelular y son moduladas principalmente por PHR1 (*Phosphorus starvation response genes*) y sus factores de transcripción asociados, mientras que las respuestas de carácter localizado, como el cambio de la arquitectura radical, se disparan a partir del censado del P extracelular (Puga y col., 2017).

Una forma de ponderar la habilidad de una planta para absorber P del suelo es el cálculo de la eficiencia de absorción de fósforo PAE (*phosphorus acquisition efficiency*) según sus siglas en inglés, que expresa la cantidad de nutriente que una planta es capaz de absorber de un sustrato determinado por unidad de tiempo y biomasa de raíz. La PAE varía notablemente de magnitud entre especies y según los sustratos. Mejorar la eficiencia del uso de los fertilizantes fosforados en los cultivos, requiere mejorar la adquisición de P por parte de las plantas (PAE), y optimizar el uso fisiológico del mismo (EPU, *efficiency of phosphorus utilization*), para aumentar la relación entre la biomasa generada y el P absorbido (Veneklaas y col., 2012).

Es conocido que el P es un importante regulador del metabolismo del carbono en plantas y la deficiencia del mismo influencia el balance entre la síntesis y el catabolismo de los metabolitos de carbono. Bajos niveles de P derivan en la acumulación relativa de más carbono en forma de almidón y reducen la asimilación de CO<sub>2</sub> (Heldt y col., 1977).

#### 1.4.1 Cambios morfológicos en la raíz

Muchas especies al crecer en sustratos deficitarios en P generan un incremento en la partición de biomasa desde la parte aérea hacia las raíces (Bradshaw y col., 1960). En especies adaptadas a déficit de P, es común observar cambios en la morfología tendientes a generar mayores capacidades exploratorias a partir de una similar generación de biomasa, como el incremento de la longitud y densidad de los pelos radicales (Itoh y Barber, 1983), la generación de raíces en racimo o el incremento de la profundidad de exploración (Christie, 1975; Fitter y Hay, 1985).

El incremento de la densidad de los pelos radicales es modulado por la capacidad de difusión del P en el suelo, ya que de esta depende la generación de áreas de agotamiento de P en torno a la raíz

por la absorción del nutriente, y la superposición de dichas áreas es la que condiciona la aparición de nuevos pelos (Ma y col., 2001).

La posibilidad de explorar mayores volúmenes de suelo manteniendo un nivel similar de biomasa, se logra también por la generación de aerénquima, que disminuye la densidad de los tejidos radicales (masa de tejido necesaria para generar un volumen de raíz), permitiendo generar un mayor volumen de raíz y superficie de contacto con el suelo a partir de una misma cantidad de masa de tejido (Fan y col., 2007), y/o por disminución del diámetro de las raíces (Hill y col., 2006), permitiendo explorar más volumen de suelo a partir de una misma masa de tejido de raíz.

### **1.4.2 Cambios fisiológicos en la planta**

El déficit de P genera respuestas a nivel fisiológico en las plantas, estos cambios tienen como objetivo incrementar la captura de P, como así también mejorar la eficiencia con la que de dicho elemento es utilizado en los procesos metabólicos.

En el primer grupo se pueden encuadrar el incremento en la expresión de genes que codifican para transportadores de P de alta afinidad en la raíz, que se suman a los transportadores de baja afinidad expresados constitutivamente (Raghothama 2000) y la asociación simbiótica de las raíces con hongos formadores de micorrizas (Harrison 2005).

Entre los mecanismos fisiológicos que posibilitan un uso más eficiente del P se destacan el incremento en la rotación interna, caracterizado fundamentalmente por la reducción en las concentraciones del ARN (Veneklaas y col., 2012), el desarrollo de vías metabólicas para la glicólisis y respiración mitocondrial menos demandantes en ATP, modificación de las membranas fosfolípicas, reemplazo de fosfolípidos por galactolípidos y sulfolípidos (Lambers y col., 2012) y modificación del metabolismo secundario, observado principalmente en el incremento de la concentración de antocianinas (Vance y col., 2003).

### **1.4.3 Exudados radicales**

Los mecanismos fisiológicos que incrementan la capacidad de absorción de nutrientes por las plantas, son acompañados por intentos de incrementar la disponibilidad de los mismos en el suelo.

Es conocido que en la rizosfera se dan numerosos procesos de interacción con la raíz y que los exudados alteran propiedades físicas y químicas del suelo adyacente a las mismas. La raíz genera modificaciones en la rizosfera que tienden a solubilizar o hidrolizar el P indisponible que se encuentra precipitado, formando parte de moléculas orgánicas o adsorbido a partículas coloidales (Hinsinger 2001). Entre los mecanismos descritos se encuentran la acidificación del suelo por la liberación de protones (H<sup>+</sup>) que mantiene el equilibrio de cargas en el interior de la raíz cuando se absorben cationes, y afectan la disponibilidad de P proveniente de compuestos inorgánicos por modificación del pH.

El exudado de ácidos orgánicos, además de modificar el pH de la rizosfera, afecta las propiedades de superficie de las partículas del suelo y sus propiedades adsorptivas. En el caso de los ácidos orgánicos de bajo peso molecular, la disminución del pH es acompañada por los efectos del anión, que ocupa el lugar de los compuestos que generan quelatos y complejos con el P. Entre los ácidos orgánicos más comunes exudados por las raíces el que mayores efectos presenta a este nivel es el citrato, que puede acumularse en el suelo hasta concentraciones de 80  $\mu\text{mol g}^{-1}$  de suelo (Gerke 2015).

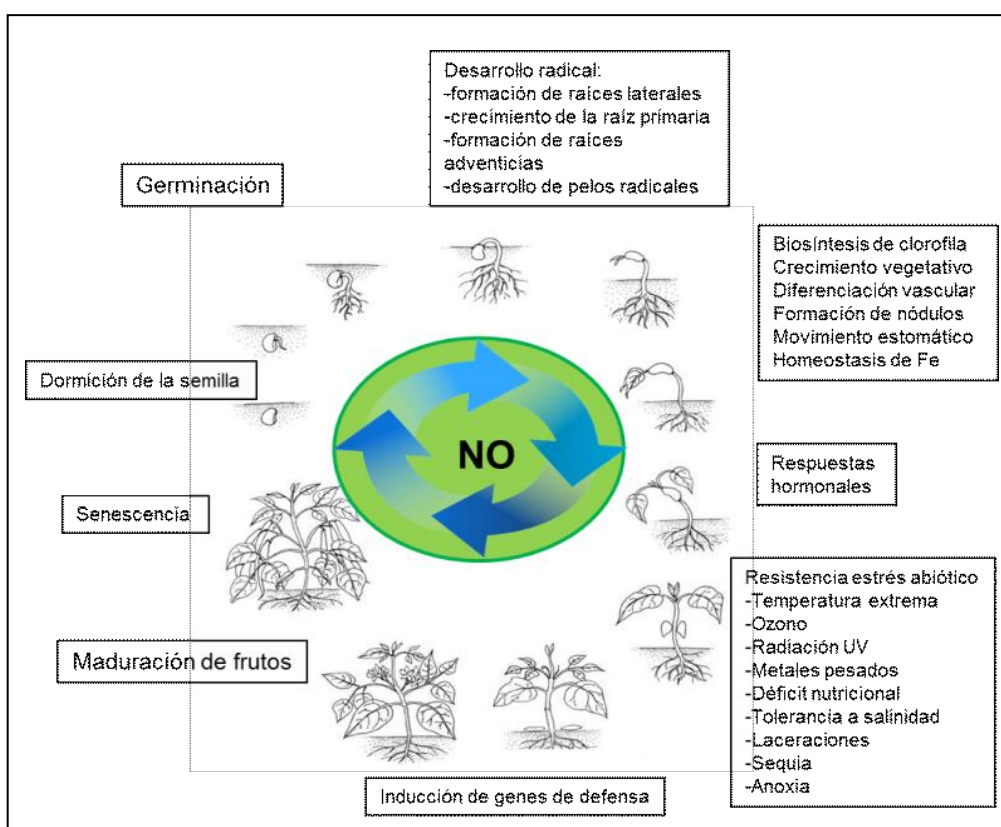
El otro mecanismo ampliamente conocido es la liberación por parte de la raíz de fosfatasa, enzimas capaces de liberar el P que está formando parte de moléculas orgánicas en el suelo y volverlo disponible en forma de P soluble (Tran y col., 2010) (Figura 1.3).

## 1.5 El óxido nítrico en las plantas

El óxido nítrico (NO) es una molécula pequeña, con gran capacidad de difusión a través de las membranas y de acción ubicua, con una vida media de menos de 6 segundos en tejidos biológicos (Thomas y col., 2001). Estas características convierten a esta molécula en una herramienta de señalización muy versátil con un amplio rango de acción sobre numerosos procesos (Lamattina y col. 2003).

El NO ha sido descrito como un potente modulador de la fisiología vegetal, participando en la dormición y germinación (Libourel y col., 2006), la apertura estomática (Bright y col., 2006), la organogénesis de la raíz (Pagnussat y col., 2002; Pagnussat y col., 2003; Pagnussat col., 2004), la fotomorfogénesis (Lozano-Juste y León, 2011) y la senescencia (Jasid y col, 2009).

Las principales fitohormonas vegetales afectan, en algún grado, la concentración de NO en los tejidos; y a su vez, el NO participa de la biosíntesis, catabolismo/conjugación, transporte, percepción, transducción de señales e interacción con numerosas fitohormonas. (Freschi, 2013; Simontacchi y col., 2013). En este sentido se han descrito interacciones con auxinas (Terrile y col., 2012), el ácido abscísico (García-Mata y Lamattina, 2002), las citokinas (Liu y col., 2013), el ácido jasmónico (Huang y col., 2004; Mur y col., 2013) y etileno (Ederli y col., 2006). Además participa de numerosas respuestas al estrés tanto biótico (Delledonne y col., 1998) como abiótico (Jasid et al., 2009; Simontacchi y col., 2015), y de la regulación de relaciones virtuosas con otros organismos como la formación de nódulos fijadores de N funcionales en soja (Leach y col., 2010) (Figura 1.5).



**Figura 1.5.** El NO participa en numerosos procesos fisiológicos y de respuesta al estrés a lo largo del ciclo ontogénico de las plantas, a través de la interacción con hormonas, especies reactivas del oxígeno, calcio y modificaciones postraduccionales de proteínas.

### 1.5.1 Síntesis de NO

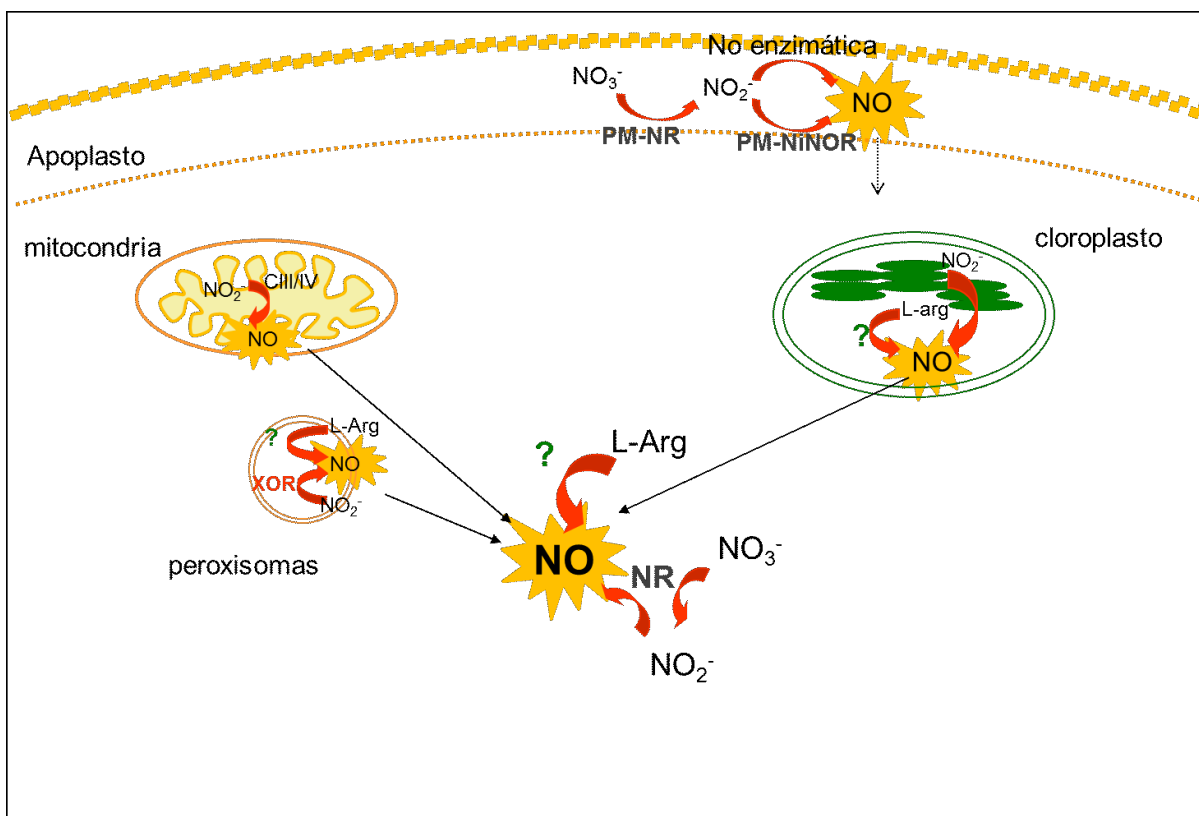
La formación de NO en mamíferos recae en la actividad de las óxido nítrico sintasas (NOS), una familia de enzimas que catalizan la oxidación de la L-arginina, con el consumo de dioxígeno (O<sub>2</sub>) y NADPH para formar L-citrulina y NO. Tres isoformas de NOS se han identificado en seres humanos (neuronal NOS -nNOS-, endotelial NOS -eNOS-, e inducible NOS -iNOS-), con diferente especificidad de tejido y requerimientos de Ca<sup>2+</sup> (Stuehr, 1999). Sin embargo el origen del NO en los tejidos vegetales es aún hoy controversial, ya que existen numerosas vías de síntesis propuestas a nivel celular y subcelular que han sido revisadas por varios autores (Astier y col., 2017; Fröhlich y Durner, 2011; Gupta y col., 2011; Moreau y col., 2010; Mur y col., 2013) (Tabla 1, Figura 1.6).

Vías oxidativas	Referencias
Dependientes de: Arginina	(Simontacchi y col., 2004; Jasid y col., 2006; Corpas y col., 2006)
Poliaminas	(Tun y col., 2006; Yamasaki y Cohen, 2006)
Hidroxilamina	(Rümer y col., 2009)
Vías reductivas (dependientes de nitrito)	
Nitrato reductasa	(Chamizo-Ampudia y col., 2016; Rockel y col., 2002; Yamasaki y Cohen, 2006)
NiNOR (nitrito NO reductasa unida a membrana) específica de raíz	(Stöhr y col., 2001)
Tilacoides suplementados con nitrito	(Jasid y col., 2006)
Cadena de transporte de electrones mitocondrial <sup>1</sup>	(Gupta y Kaiser, 2010; Gupta y col., 2005)
XOR (xantina oxidoreductasa peroxisomal)	(Godber y col., 2000; Wang et al., 2010)
Reducción no enzimática de nitrito <sup>2</sup>	(Bethke y col. 2004)

**Tabla 1.1.** Fuentes propuestas de generación de NO en plantas

<sup>1</sup> En condiciones de baja disponibilidad de oxígeno y determinada por la disponibilidad de nitrito

<sup>2</sup> En el apoplasto



**Figura 1.6.** Principales sitios y vías propuestas de generación de NO en plantas. NR, nitrato reductasa; PM-NR, nitrato reductasa unida a membrana; PM-NiNOR, Nitrito NO reductasa unida a membrana; XOR, xantina oxido reductasa. Los signos de interrogación denotan el desconocimiento de la/las proteína(s) implicadas en torno a la generación de NO dependiente de arginina.

Jeandroz y col. (2016), investigaron la presencia de la enzima NOS en más de 1000 especies de plantas terrestres y en algas y no encontraron secuencias de NOS en los genomas disponibles de plantas, incluso donde actividades NOS-like habían sido medidas como *Arabidopsis*, tabaco y arveja. Solo pocas especies de algas contienen ortólogos de NOS, como *Ostreococcus tauri* (Foresi y col, 2010). Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que una o varias proteínas no relacionadas estructuralmente con la NOS puedan dar cuenta de la generación de NO dependiente de arginina observada en algunas plantas. Por otra parte, la actividad NOS-like podría resultar de la cooperación entre proteínas discretas que juntas puedan generar NO (Corpas y Barroso, 2017). En relación con la síntesis de NO dependiente de nitrito, recientemente Chamizo-Ampudia y col. (2016) propusieron que en *Chlamydomonas reinhardtii* la NR puede proporcionar electrones provenientes de NAD(P)H a través de su actividad diaforasa/deshidrogenasa a una molibdoenzima, NOFNiR (*NO-forming nitrite reductase*) o también llamada ARC (*Amidoxime Reducing Component*) que sería la responsable de la síntesis de NO a partir de nitrito, incluso en presencia de nitrato,



condiciones en las cuales la NR es incapaz de producirlo por inhibición competitiva. Sin embargo la presencia de este sistema en las plantas y su regulación requiere más estudios (Chamizo-Ampudia y col., 2017).

Así, las plantas parecen haber perdido las NOS en el curso de la evolución. Sin embargo han podido desarrollar mecanismos eficientes para asimilar y reducir el nitrato, y pueden haber optimizado el uso de nitrito como principal fuente de NO (Jeandroz y col., 2016; Santolini y col., 2017).

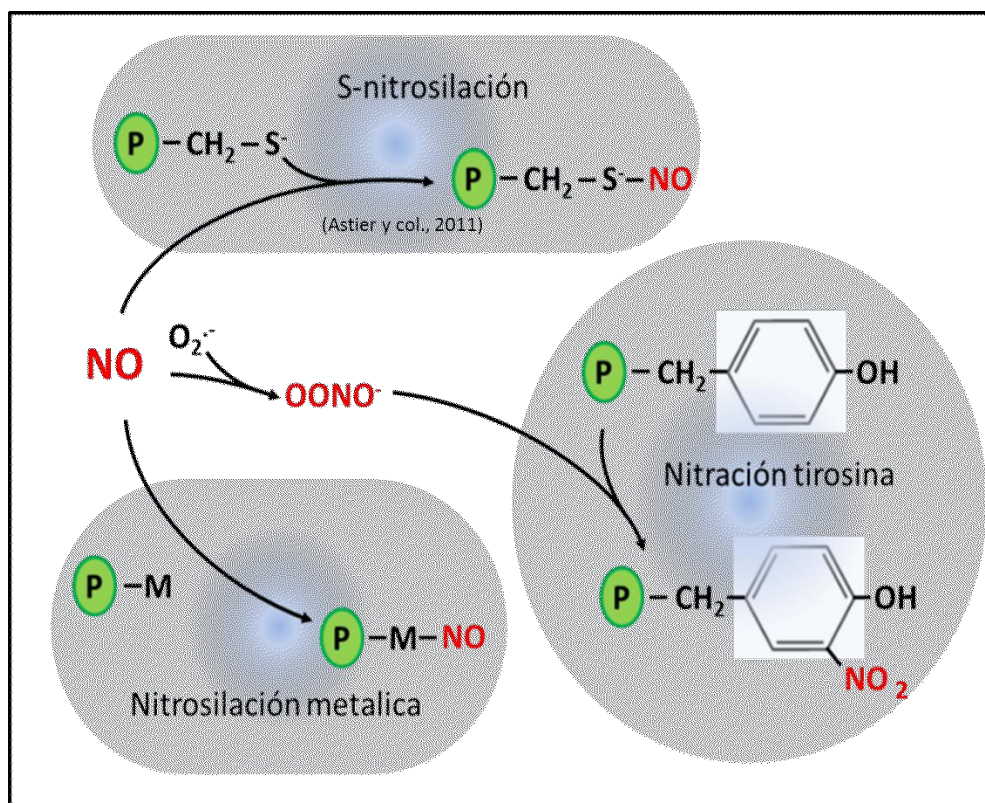
### 1.5.2 Mecanismos de acción del NO

La participación del NO en procesos tan variados del metabolismo encuentra su fundamento en los blancos de reacción presentes en los sistemas biológicos (Figura 1.7). La reacción con grupos –SH presentes en aminoácidos conduce a una modificación postraducciona denominada S-nitrosilación. Mediante esta interacción con las cisteínas presentes en proteínas el NO participa de la transducción de numerosas señales (Lindermayr y col., 2005). La especificidad de esta modificación postraducciona estaría dada por su ocurrencia en los residuos cisteína y por la presencia de determinados aminoácidos en el entorno (Astier y col., 2011). Algunos ejemplos de S-nitrosilación en plantas incluyen la modulación de enzimas biosintéticas de fitohormonas, receptores y proteínas involucradas en la transducción de señales (Freschi 2013).

Un segundo mecanismo de acción involucra otra modificación postraducciona, la nitración de proteínas. Requiere la interacción con una especie reactiva del oxígeno como es el anión superóxido ( $O_2^-$ ), para formar el peroxinitrito ( $OONO^-$ ), el cual a su vez reacciona con los residuos tirosina nitrándolos. Se reconoce la participación de este mecanismo en la regulación de procesos como la fotosíntesis, la respiración y el metabolismo del nitrógeno (Freschi 2013).

Un tercer mecanismo de modificación postraducciona involucra la unión del NO con el metal de las metaloproteínas (nitrosilación metálica). Uno de los ejemplos mejor caracterizados es la activación de la guanilato ciclasa en sistemas animales (Ignarro y col., 1999).

Las modificaciones mencionadas (S-nitrosilación, nitración y nitrosilación metálica) pueden conducir a cambios importantes en las actividades enzimáticas o en la función de proteínas.



**Figura 1.7.** Esquema de los mecanismos de acción del NO a través de su interacción con proteínas (representadas como P). Tomado y modificado de Freschi y col. (2013)

### 1.5.3 El óxido nítrico y las respuestas al stress

Las plantas, como organismos sésiles, incapaces de desplazarse hacia lugares más aptos para su metabolismo, necesitan adaptarse a las condiciones ambientales impuestas por el sitio donde germinan, crecen y se desarrollan. Para hacerlo, deben ser capaces de mantener sus variables metabólicas dentro de estrechos márgenes mientras el entorno las somete a grandes variaciones de temperatura, disponibilidad de agua, oferta nutricional, radiación solar, salinidad, exposición a patógenos, laceraciones/herbivoría, y otras fuentes de estrés; que colocan a las respuestas adaptativas como un elemento central en el desarrollo de las plantas (Simontacchi y col., 2015).

Desde fines de los años 70 del siglo pasado, se reconoce al NO como un compuesto sintetizado por las plantas, tanto en condiciones normales como frente a situaciones de estrés (Klepper 1979). Su actividad biológica fue descrita poco tiempo después, inicialmente para mamíferos (Furchgott y Zawadzki, 1980), siendo los estudios pioneros sobre el rol fisiológico del NO en plantas

desarrollados desde mediados de los años 90 (Leshem y Wills, 1998; Leshem y Haramaty, 1996; Noritake y col., 1996).

Desde ese entonces, se han desarrollado gran cantidad de experiencias para profundizar sobre la participación del NO en las respuestas de las plantas a las más diversas situaciones de estrés principalmente el estrés hídrico (García-Mata y Lamattina, 2001), la salinidad (Zhao y col., 2007), las temperaturas extremas (Zhao y col., 2009), la deficiencia de hierro (Graziano y col., 2002), el estrés oxidativo (Guo y Crawford, 2005), y la participación en mecanismos de tolerancia a toxicidad por cadmio (Laspina y col., 2005) y arsénico (Singh y col., 2009) entre otros tantos. El NO también participa de respuestas a estrés biótico, como ha quedado establecido a partir de los trabajos pioneros que lo describen como una molécula clave para el establecimiento de la respuesta hipersensitiva (HR) y en la relación con patógenos en general (Delledonne et al., 1998; Romero-Puertas y col., 2004).

#### **1.5.4 Interacción del óxido nítrico y el P en el metabolismo vegetal**

Los trabajos que vinculan el metabolismo del hierro (absorción, distribución en la planta y biodisponibilidad) con el NO, han abierto un nuevo campo de estudio en lo concerniente a la relación del NO con las respuestas asociadas a otros déficit nutricionales (Graziano y col., 2002; Simontacchi y col., 2012).

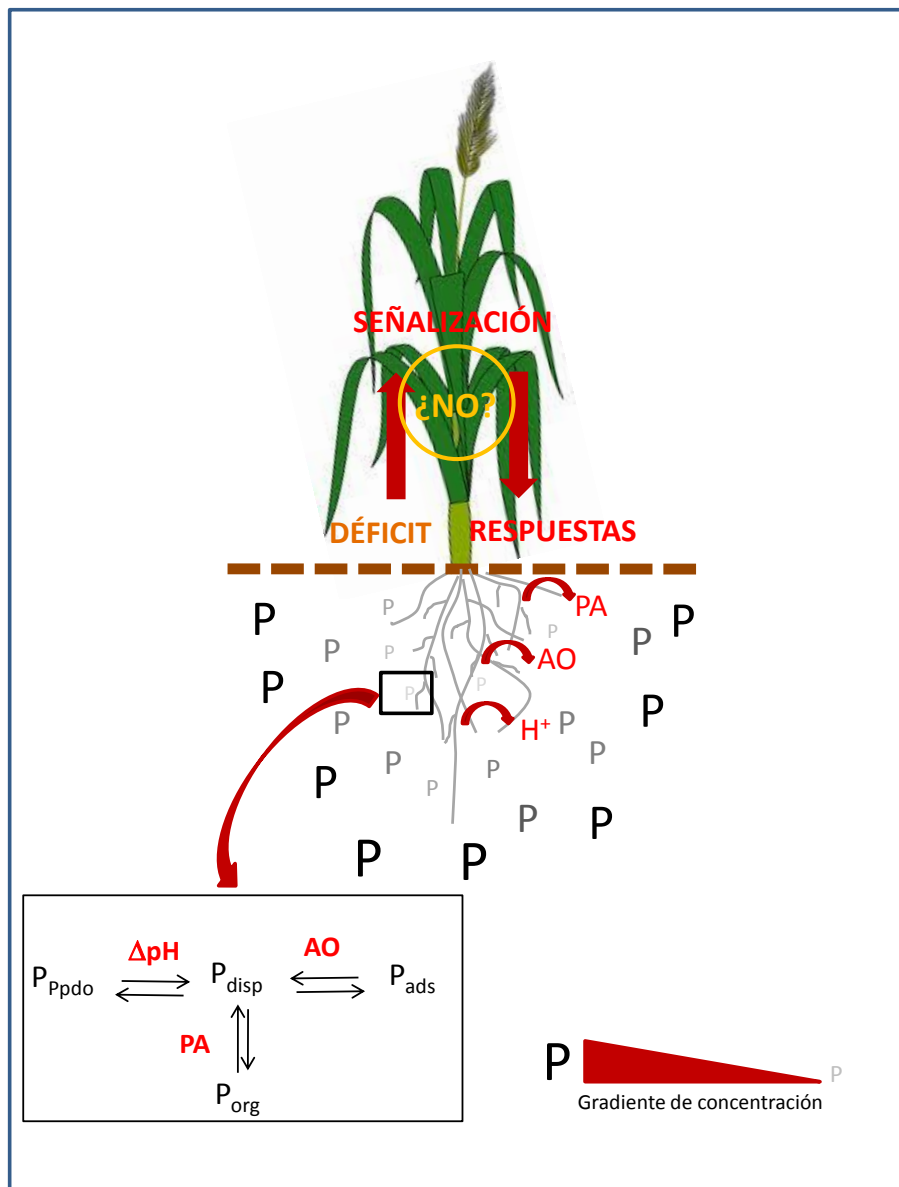
En el caso particular del P, se ha descripto la participación del NO en las respuestas de las plantas a la restricción de este nutriente a partir de trabajos realizados en lupino (*Lupinus albus*). En esta especie en particular, la deficiencia de P desencadena la formación de raíces tipo “cluster”, lo cual se encuentra acompañado por la liberación al medio externo de sustancias de bajo peso molecular, como ácidos orgánicos y protones (Meng y col., 2012; Wang y col., 2010). Estas respuestas, de aclimatación a la baja disponibilidad de P, contribuyen a incrementar la adquisición de P desde el suelo (Niu y col., 2012). Resulta muy interesante que las plantas de lupino expuestas a restricción de P, exhiban un incremento en los niveles de NO en las raíces primarias y secundarias, en directa relación con los cambios morfológicos y fisiológicos de aclimatación (Wang y col., 2010).

En este modelo en particular, se ha propuesto que la degradación de ácidos nucleicos, que constituyen el reservorio más importante de P en las plantas que están sometidas a restricción de P, genera una elevada cantidad de purinas que son metabolizadas por la enzima xantina oxido-

reductasa (XOR), la cual puede también participar en la síntesis endógena de NO (Tabla 1.1; Figura 1.6). La restricción de P genera como consecuencia una mayor producción de NO, que a su vez actúa favoreciendo la adquisición de P desde el medio (Wang et al., 2010). Consistente con estas observaciones se describió que plantas de *Arabidopsis* y de arroz expuestas a restricción de P presentan elevada producción de NO (Royo y col., 2015; Wu y col., 2014; Zhu y col., 2017).

En el caso del arroz, frente al déficit de P, se genera una interacción entre el NO y etileno que favorece el reciclado de P interno (Zhu y col., 2017), y en *Arabidopsis* el crecimiento de la raíz es afectado por la interacción entre el NO y las giberelinas (Wu y col., 2014).

Sin embargo, no se conoce aún en profundidad qué otras respuestas al déficit de P podrían estar siendo moduladas por el NO (Figura 1.8), siendo estos aspectos de particular interés en el desarrollo de esta tesis doctoral.



**Figura 1.8.** Esquema integra aspectos de la dinámica del P en el suelo y algunas respuestas desencadenadas frente al déficit, y plantea como interrogante la participación del NO en algunos de estos procesos. Inserto: formas de P presentes en el suelo y su interrelación. Abreviaturas: P<sub>pdo</sub>, P precipitado; P<sub>ads</sub>, P adsorbido; P<sub>disp</sub>, P disponible; P<sub>org</sub>, P orgánico; ΔpH, cambio en el pH del suelo; AO, ácidos orgánicos (ej. citrato, malato); PA, enzimas fosfatasas ácidas; NO, óxido nítrico.

# Objetivos e hipótesis

---



## 2.1 Hipótesis General

*La eficiencia de absorción y utilización de P es modulada por el NO.*

Ante el estrés producido por el déficit de P las plantas de maíz y soja reaccionan poniendo en marcha cambios metabólicos y mecanismos que permiten incrementar la absorción de P, como es el caso de la acidificación de la rizósfera y los cambios en las constantes del influjo de absorción de P. Otro punto de regulación es el incremento en la eficiencia de utilización del P dentro de la planta, a través de la modificación de la dinámica de removilización de P mediante la modulación de la senescencia. La aplicación de dadores y secuestrantes de NO modificará el rango de respuestas, evidenciando en mayor medida el rol que el mismo desempeña en las mencionadas respuestas adaptativas.

## 2.2 Objetivos específicos

*Objetivo específico 1:* Estudiar el efecto del NO sobre la eficiencia en el uso de P durante el curso de la deficiencia de este nutriente en plantas de maíz. De modo particular la hipótesis de trabajo es que distintos indicadores de la eficiencia de adquisición y utilización de P responden positivamente al agregado de dadores de NO durante el curso de la deficiencia prolongada de P. Se evaluará, además, si los eventuales cambios en ambas eficiencias generados por los dadores se encuentran asociados a cambios en la captura de  $\text{HPO}_4^{2-}$ , el tiempo de aparición de síntomas de senescencia, la respuesta antioxidante y la acumulación de antocianinas.

*Objetivo específico 2:* Analizar las posibles modificaciones en los niveles de NO como consecuencia de la privación de P y su relación con las respuestas adaptativas observadas. Se analizarán los cambios en los niveles de NO en raíz y parte aérea en relación a la deficiencia de P en plantas de maíz y de soja. La hipótesis a contrastar es que durante el desarrollo de las respuestas a la restricción de P, el NO constituye una pieza clave ocurriendo cambios apreciables en la generación de esta especie activa.

*Objetivo específico 3:* Estudiar el efecto del nivel de suministro de P sobre las vías de síntesis de NO. En este objetivo se pondrá el énfasis en la participación de los cloroplastos en el balance de

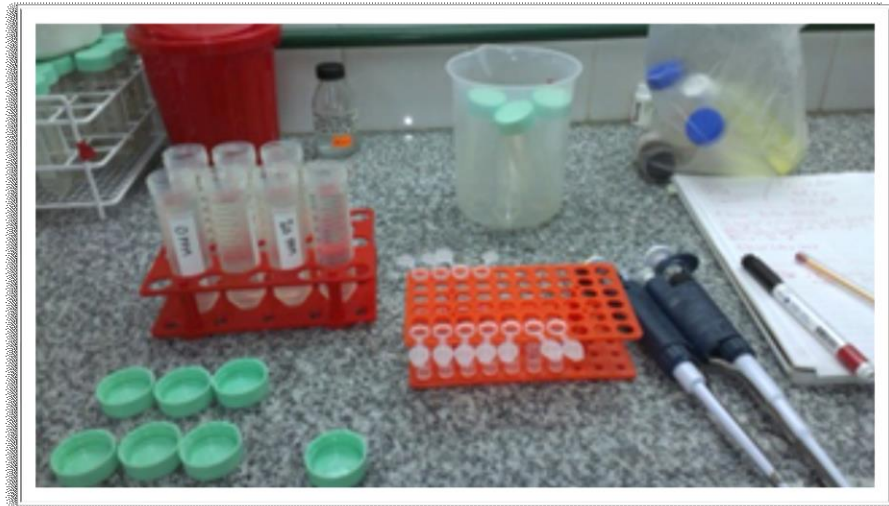
NO a nivel celular en plantas de soja y maíz sometidas a deficiencia de P. De modo particular, en maíz, se analizará en forma diferencial la producción de NO en células de la vaina y del mesófilo. La hipótesis que se plantea es que, debido a sus diferencias estructurales y funcionales, la contribución de ambos tipos celulares a la síntesis de NO difiere entre plantas cultivadas en distintos niveles de suministro de P.

*Objetivo específico 4:* Estudiar el efecto del nivel de suministro de P sobre el proteoma de plantas de soja. En forma particular se identificarán las proteínas nitradas en residuos tirosina presentes en plantas cultivadas con bajo suministro de P. La hipótesis a contrastar es que esta modificación post-traducciona l de proteínas es selectiva, dependiente de NO y que guarda relación con la ejecución de las respuestas adaptativas puestas en marcha frente a la deficiencia del nutriente.



# Materiales y métodos

---



### 3.1 Material biológico, condiciones de cultivo y tratamientos

En los ensayos realizados con plantas de maíz (*Zea mays*) se empleó el híbrido Ax882 CI-MG. En los ensayos realizados con plántulas de soja se emplearon semillas de soja *Glycine max* cv. Williams 82.

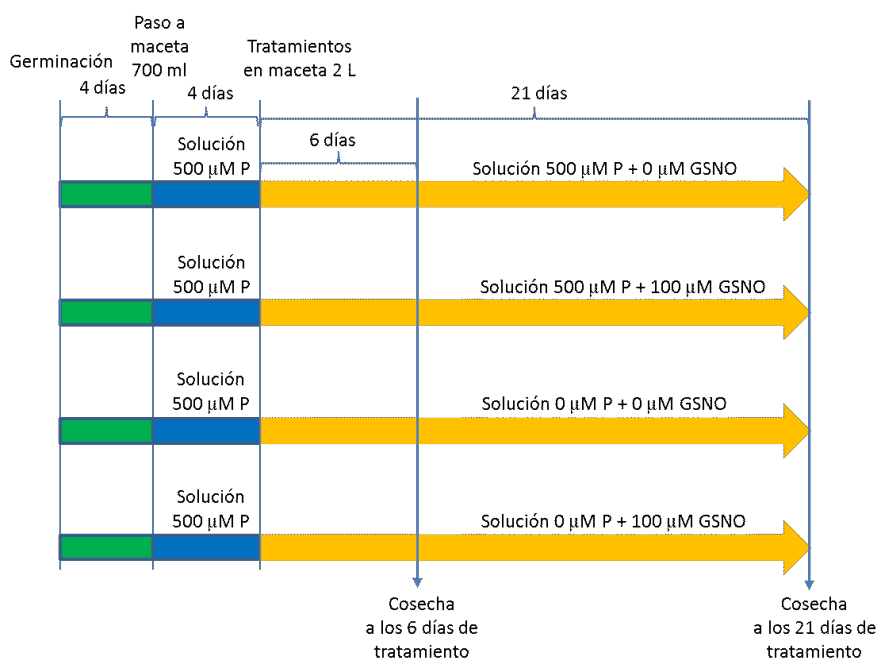
Las semillas de maíz utilizadas cuentan con un tratamiento previo con fungicidas realizado por el proveedor, lo cual permitió germinarlas directamente. Las semillas fueron colocadas para su germinación en bandejas desinfectadas, sobre un colchón de algodón cubierto por papel absorbente y humedecido con agua destilada. Las bandejas fueron emplazadas en una cámara oscura con una temperatura constante de 28°C durante 4 días.

Las semillas germinadas fueron transferidas a macetas de 700 ml de capacidad conteniendo solución nutritiva con la siguiente composición:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  1 mM; KCl 1 mM;  $\text{MgSO}_4$  0,5 mM;  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,5 mM; FeNaEDTA 200  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CaCl}_2$  50  $\mu\text{M}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  25  $\mu\text{M}$ ;  $\text{MnSO}_4$  2  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CuSO}_4$  0,5  $\mu\text{M}$ ;  $\text{NaMoO}_4$  0,5  $\mu\text{M}$ ;  $\text{ZnSO}_4$  2  $\mu\text{M}$ ; ácido 2-N-morfolinoetanosulfónico (MES) 2,5 mM y llevada a pH 5,9-6,0 con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Las plantas se cultivaron en invernáculo durante 4 días, luego se seleccionaron 20 plantas homogéneas las cuales se traspasaron a macetas de 2 litros (una planta por maceta) donde recibieron cuatro tratamientos resultantes de la combinación de dos niveles de fósforo (0 y 0,5 mM) y dos niveles de S-nitrosoglutathione (GSNO) empleado como dador de óxido nítrico (NO) (0 y 0,1 mM) (5 plantas por tratamiento). Dado que la cantidad necesaria de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  para llevar a pH entre la solución +P y la -P resultó distinta, el faltante de  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución -P se corrigió con el agregado de  $\text{CaCl}_2$ . Las plantas permanecieron recibiendo los tratamientos durante 6 ó 21 días (Figura 3.1), completando un total de días desde la siembra de 14 y 29, respectivamente. Las soluciones fueron aireadas continuamente y renovadas completamente cada cuatro días, al igual que los tratamientos con GSNO. Para definir la duración de los experimentos de corto plazo se siguió el criterio establecido por Cogliatti y Clarkson (1983), cosechando y llevando adelante las mediciones cuando las plantas presentaban un 20% de diferencia en el crecimiento entre las dos concentraciones de P, que en nuestras condiciones experimentales fue a los 6 días de tratamiento. La duración de los experimentos de largo plazo, cosechados a los 21 días de déficit, se definió como el momento en el cual las plantas presentaban diferencias visuales evidentes en relación al crecimiento, color y senescencia de hojas más viejas.

Los experimentos se llevaron a cabo durante el final de la primavera y el verano, con temperaturas mínimas y máximas limitadas a un rango de 15 y 35 °C en un invernáculo con regulación térmica, y con una radiación correspondiente a 34.95° de latitud sur.



**Imagen 3.1:** Invernáculo ubicado en el INFIVE. Plántulas de maíz al inicio del experimento.

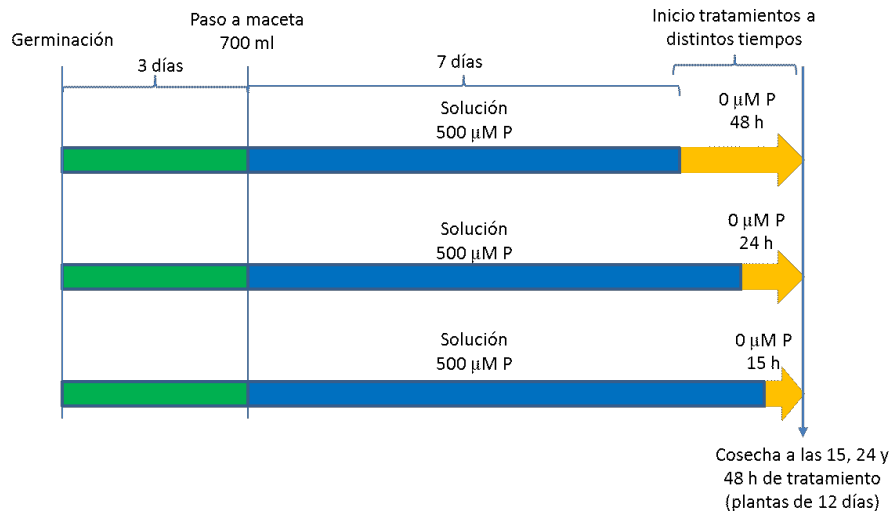


**Figura 3.1.** Diseño experimental para experimento con plantas de maíz en invernáculo con 6 y 21 días de restricción de P. Semillas de maíz fueron germinadas en cámara a 28 °C en condiciones de humedad y oscuridad durante 4 días, posteriormente fueron transferidas a macetas de 700 ml conteniendo solución nutritiva de Hoagland completa durante 4 días, y luego se transfirieron a macetas de 2 litros conteniendo los tratamientos generados a partir de la combinación de dos niveles de P (0 y 500  $\mu$ M) y dos niveles de GSNO (0 y 100  $\mu$ M).

Para los experimentos con plantas de soja, las semillas (*Glycine max*, cv Williams 82) se esterilizaron mediante lavado con solución de hipoclorito de sodio 10% durante 5 minutos, se enjuagaron 3 veces en agua destilada y se germinaron en oscuridad durante 3 días a 28°C. Posteriormente se transfirieron a recipientes plásticos de 700 ml de capacidad, conteniendo solución nutritiva con la siguiente composición:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)$  1mM; KCl 1 mM;  $\text{MgSO}_4$  0,5 mM;  $\text{H}_3\text{PO}_4$  0,5 mM;  $\text{CaCl}_2$  50  $\mu\text{M}$ ; FeNaEDTA 50  $\mu\text{M}$ ;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  25  $\mu\text{M}$ ;  $\text{MnSO}_4$  2  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CuSO}_4$  0,5  $\mu\text{M}$ ;  $\text{NaMoO}_4$  0,5  $\mu\text{M}$ ;  $\text{ZnSO}_4$  2  $\mu\text{M}$ ; MES 2,5 mM, pH 5,9-6,0 ajustado con  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Dado que la cantidad necesaria de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  para llevar a pH entre la solución +P y la -P resultó distinta, el faltante de  $\text{Ca}^{2+}$  en la solución -P se corrigió con el agregado de  $\text{CaCl}_2$ . Las plantas crecieron en cámara (Percival Intellus Control System) con una irradiancia de 180  $\mu\text{mol}$  fotones/ $\text{m}^2$  s, bajo un fotoperíodo de 16 h, con una humedad relativa de 80% y una temperatura de 28/22°C (día/noche) (Imagen 2). A partir de los 7 días de cultivo, se realizaron los tratamientos de restricción de P transfiriendo las plantas a una solución de igual composición pero sin agregado de P durante 15, 24 y 48 h. A los 12 días se realizó la cosecha de las plantas (Figura 3.2).

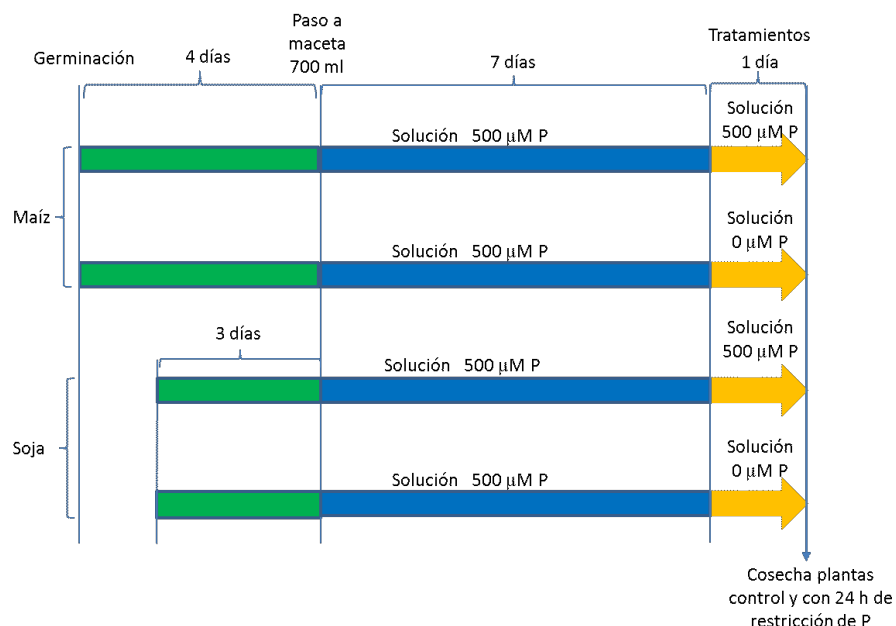


**Imagen 2:** Cámara de cultivo (Percival Intellus Control System).



**Figura 3.2:** Diseño experimental para experimento de soja en cámara con 15, 24 y 48 h de restricción de P. Semillas de soja fueron germinadas en cámara a 28°C en condiciones de humedad y oscuridad durante 3 días, posteriormente fueron transferidas a macetas de 700 ml conteniendo solución nutritiva de Hoagland completa. A los 12 días se realizó la cosecha habiendo aplicado tratamientos de restricción de P con 15, 24 y 48 h de anterioridad.

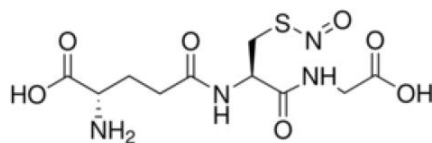
En los experimentos comparativos soja-maíz, las plantas crecieron en invernáculo en las soluciones nutritivas descritas anteriormente para cada sistema, bajo idénticas condiciones ambientales a las descritas para maíz. Las soluciones fueron aireadas continuamente y renovadas acorde al crecimiento de las plantas con el fin de evitar el agotamiento de los nutrientes. Luego de 7 días las plantas se transfirieron a soluciones nutritivas sin P por un período de 24 h (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Diseño experimental para experimento de maíz y soja en invernáculo con 24 h de déficit de P. Semillas de maíz y soja fueron germinadas en cámara a 28°C en condiciones de humedad y oscuridad durante 4 y 3 días respectivamente, posteriormente fueron transferidas a macetas de 700 ml conteniendo solución nutritiva de Hoagland completa durante 7 días, y luego se transvasaron a macetas conteniendo solución nutritiva con dos niveles de P (0 y 500µM) durante 24 horas.

### 3.2 Síntesis del dador de NO y cuantificación de la liberación de NO

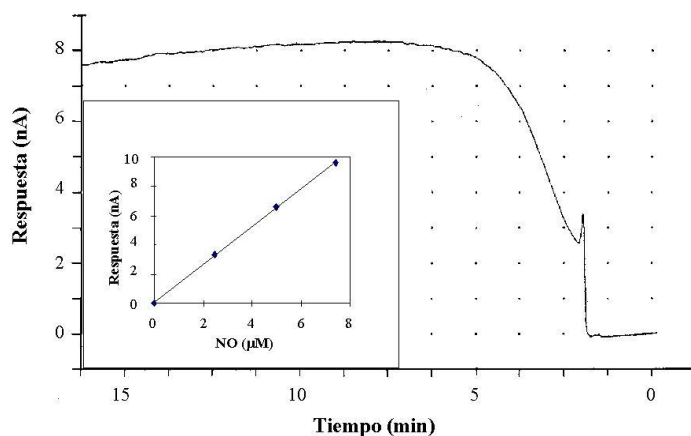
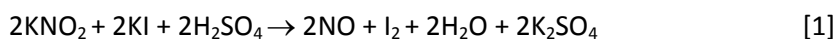
El dador de NO, GSNO, fue obtenido a partir de la reacción de volúmenes iguales de glutatión reducido (GSH) 200 mM disuelto en agua destilada, y NaNO<sub>2</sub> 200 mM en HCl 0,1 N (Singh et al., 1996), y preparado siempre inmediatamente antes de cada aplicación.



**Figura 3.4:** Estructura química del S-nitrosoglutation (GSNO).

La liberación de NO a partir del GSNO fue evaluada electroquímicamente empleando un electrodo WPI ISO NO Mark II (ISO-NOP 200 µm diameter shielded micro-sensor) (Liu y col., 2005) en solución nutritiva aireada, simulando la condición de cultivo.

El electrodo selectivo Iso-NO, es un sensor amperométrico. El NO difunde a través de la membrana selectiva y es oxidado en el electrodo, como resultado se obtiene una corriente eléctrica, proporcional a la concentración de NO en la muestra. Las lecturas de corriente se transforman en concentración de NO a partir de una curva de calibración. El método más conveniente de calibración se fundamenta en la generación de cantidades conocidas de NO a partir de nitrito. Para generar NO se utilizaron dos soluciones, la solución 1: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M + KI 0,1 M y la solución 2: KNO<sub>2</sub> (o NaNO<sub>2</sub>) en concentración adecuada. El método de calibración se basa en la reacción 1, en la cual una cantidad conocida de KNO<sub>2</sub> adicionada al medio genera una cantidad conocida de NO, la cual puede ser calculada directamente a partir de la estequiometría de la reacción. Tanto el KI como el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> están en exceso, por lo tanto, el reactivo limitante es el KNO<sub>2</sub>. Como la reacción avanza hasta completarse, la cantidad de NO generada resulta igual a la cantidad de KNO<sub>2</sub> adicionada y la concentración de NO en la solución es igual a la concentración final de KNO<sub>2</sub> en la solución de medida (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Medición de la generación de NO utilizando un electrodo selectivo. **Inserto:** Curva de calibración estándar de NO generado a partir de nitrito en medio ácido. La respuesta del electrodo está dada en unidades de corriente. El sensor de NO es amperométrico, el NO difunde a través de la membrana selectiva y es oxidado en el electrodo, resultando en una corriente eléctrica (nA) que es proporcional a la concentración de NO en la muestra.

Una vez calibrado el electrodo, se procede a determinar la generación de NO por el dador químico midiendo la intensidad de la señal en unidades de corriente en función del tiempo y se transforman los valores en concentración de NO a partir de la curva de calibración.

Además, la degradación del GSNO también fue cuantificada espectrofotométricamente a lo largo del tiempo, a una longitud de onda de 335 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar  $\epsilon = 922 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Singh y col., 1996).

### 3.3 Medición de parámetros morfológicos y fenológicos

Durante el periodo de cultivo de las plantas de maíz, se determinó la tasa de aparición de hojas (filocrono), considerando a la última hoja en expansión como una fracción de la anteúltima hoja, utilizando la siguiente formula.

$$\text{Nº Hojas} = \text{Nº de hojas} - 1 + \left( \frac{\text{longitud ultima hoja}}{\text{Longitud ante ultima hoja}} \right)$$

Una vez cosechadas las plantas se determinó el peso fresco (PF) y el peso seco (PS), y la longitud de cada hoja individual y de la raíz. Se utilizó una balanza electrónica analítica de alta precisión. Para la determinación de PS se colocaron los tejidos en viales de vidrio en estufa a 60°C hasta peso constante.

### 3.4 Determinación de parámetros fotosintéticos

Los parámetros fotosintéticos fueron determinados en las hojas 1, 2, 3, 4 y 5 en las plantas de maíz. La hoja 6 no se encontraba expandida en muchas de las plantas analizadas razón por la cual no se incluyeron datos provenientes de la misma. En el caso de las plantas de soja, se utilizaron las hojas unifoliadas.

El contenido de clorofila se determinó en base a la técnica descripta por Moran y Porath (1980) para tejidos intactos. Se cortaron discos de hojas de 6 mm de diámetro y se sumergieron en 1 ml de N,N-dimetilformamida (DMF) durante toda la noche. El extracto obtenido fue analizado espectrofotométricamente a dos longitudes de onda, 664 y 647 nm. La concentración de clorofila



fue calculada según las ecuaciones propuestas por Inskeep y Bloom (1985) y expresada en función del área foliar en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ :

$$[\text{clorofila } a] = (12,25 \cdot A_{663\text{nm}} - 2,79 \cdot A_{647\text{nm}}) \cdot 0,001 \cdot (1000/\text{AF})$$

$$[\text{clorofila } b] = (21,50 \cdot A_{647\text{nm}} - 5,10 \cdot A_{663\text{nm}}) \cdot 0,001 \cdot (1000/\text{AF})$$

$$[\text{clorofila total}] = (17,95 \cdot A_{647\text{nm}} + 7,90 \cdot A_{663\text{nm}}) \cdot 0,001 \cdot (1000/\text{AF})$$

Donde  $A_{663\text{nm}}$  y  $A_{647\text{nm}}$  corresponden al valor de absorbancia a  $\lambda = 663$  y  $\lambda = 647$  nm respectivamente, y AF es el área foliar expresada en  $\text{cm}^2$ .

Para la estimación del contenido de clorofila en plantas de maíz y soja de manera no destructiva, se empleó un medidor portable de clorofila SPAD 502 (Minolta, Konoca Minolta Sensing, inc.), ya que ha sido demostrado una buena correlación del índice SPAD con la concentración de clorofila (Martínez y Guiamet 2004). Para obtener el valor de contenido de clorofila por sección de hoja se realizó el promedio de tres medidas en base, centro y ápice de la hoja, a la misma hora de iniciado el fotoperíodo, según se indique para cada condición experimental.

El rendimiento cuántico del fotosistema II ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ), fue determinado utilizando un detector de fluorescencia Hansatech Instruments, UK, type FM52, a la misma hora de iniciado el fotoperíodo según se indique para cada condición experimental.

### 3.5 Determinación del contenido de antocianinas

Las antocianinas se determinaron tomando 500 mg de tejido previamente pulverizado en nitrógeno líquido, los cuales fueron adicionados con 5 ml de etanol puro conteniendo HCl 1% y permanecieron durante toda la noche a  $4^\circ\text{C}$  en oscuridad. Se determinó la absorbancia espectrofotométricamente a 530 nm previa centrifugación a 10.000 g durante 20 minutos, para evitar la presencia de partículas en suspensión (Suzuki y col. 1995). Los datos fueron expresados en términos relativos de absorbancia (unidades arbitrarias, UA) para los diferentes tratamientos.

### 3.6 Determinación de intercambio gaseoso

Se utilizó un porómetro (Decagon sc-1, LI-1600, LI-COR, NE, USA) como herramienta para determinar la apertura estomática, a partir de la cuantificación de los  $\text{mmoles m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  de agua que la planta transpira. Las mediciones se llevaron a una misma hora del inicio del fotoperíodo, según se indique en cada caso, en la cara abaxial de las hojas completamente expandidas de plantas de maíz y en las hojas unifoliadas en plantas de soja.

### 3.7 Determinación del contenido de P

#### 3.7.1. Determinación de contenido de P en los tejidos vegetales

A fin de determinar el contenido de P en los diferentes tejidos, una vez medido el peso seco, las muestras se redujeron a cenizas en mufla a  $550^{\circ}\text{C}$  durante 5 h. Posteriormente las cenizas, previamente enfriadas, se diluyeron en 500  $\mu\text{l}$  de ácido nítrico y 3 ml de agua calidad milliQ. Para llevar adelante la determinación se utilizó el método colorimétrico del fosfo-molibdo-vanadato (Kitson y Mellon, 1944), con modificaciones. Se realizó una curva de calibración a partir de la dilución de una solución patrón de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (100 ppm) en  $\text{HNO}_3$  (diluido en relación 1 en 7 en agua milliQ), para preparar soluciones con una concentración de P en el rango de 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 ppm.

La reacción colorimétrica se realizó mezclando 250  $\mu\text{l}$  de muestra con 100  $\mu\text{l}$  de la solución A, compuesta por  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  0,25% en  $\text{HNO}_3$  1,3%; y 100  $\mu\text{l}$  de la solución B, compuesta por  $(\text{NH}_4)_7\text{Mo}_7\text{O}_{20} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  al 5% en agua destilada y 550  $\mu\text{l}$  de agua calidad milliQ para alcanzar un volumen final de 1 ml. Finalmente, se determinó la absorbancia a longitud de onda de 460 nm en el espectrofotómetro.

#### 3.7.2. Determinación del contenido de P en las soluciones nutritivas

Para determinar P en soluciones nutritivas se empleó la técnica descrita por Murphy y Riley (1962). Para ello se realizó la mezcla de 1 ml de solución nutritiva con 0,2 ml de la mezcla de reacción preparada a partir de 12,5 ml de ácido sulfúrico 5 N; 3,75 ml de molibdato de amonio

(preparado mezclando 20 gr en 50 ml de agua destilada); 7,5 ml de ácido ascórbico 0,1 M y 1,25 ml de solución de tartarato potásico de antimonio (preparada disolviendo 0,2743 gr de la sal en 10 ml de agua). Se midió la absorbancia de las muestras a 882 nm y se determinó el contenido de P mediante la realización de una curva de calibración, generada a partir de diluciones sucesivas de la misma solución nutritiva de concentración inicial 500  $\mu\text{M}$  utilizada en el experimento.

### 3.8 Estimación de índices de eficiencia en el uso del P

A fin de llevar adelante la estimación de la eficiencia interna de utilización del fosforo (EPU) por sus siglas en inglés "*efficiency of phosphorus utilization*", la cantidad total de P y el peso seco fueron medidos en plantas al inicio del tratamiento de restricción de P y al momento de finalizar el mismo (8 y 29 días de vida en este caso). La EPU fue estimada siempre en plantas en las cuales la restricción de P ya había generado cambios significativos en la producción de biomasa en relación a las plantas control. Las estimaciones de EPU tanto estáticas como dinámicas, fueron calculadas de acuerdo a Santa-María y col. (2015):

$$\text{EPUo: } W \, n_i^{-1}$$

$$\text{EPUu: } W^2 \, n_i^{-1}$$

$$\text{EPUi: } (dW/dt) \, n_i^{-1}$$

$$\text{EPUe: } [(\ln W_f - \ln W_i)/(t_f - t_i)] \, n_i \, w^{-1}$$

Donde  $n_j$ , es la cantidad de P en la planta,  $t$  es el tiempo y  $W$  es la biomasa de peso seco. Los subíndices  $f$  e  $i$  significan final e inicial respectivamente. Los subíndices  $o$ ,  $u$ ,  $i$  y  $e$ , se colocan a fin de diferenciar los distintos índices.

### 3.9 Determinación de la capacidad instantánea de absorción de P por las raíces

Para la determinación de la capacidad de absorción de P por las raíces, el día previo a la medición se renovó completamente la solución nutritiva de cada uno de los tratamientos y la experiencia se llevó adelante transfiriendo las plantas a macetas de 300 ml de capacidad conteniendo solución nutritiva de concentración de 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{PO}_4$ , pH 5,9-6. En el momento de transferir las plantas se

llevó adelante un lavado de las raíces durante 30 segundos en agua destilada para retirar el P débilmente unido a la superficie de la raíz.

Las macetas fueron pesadas antes y después del experimento para estimar la tasa de evapotranspiración y también se colocaron macetas en idénticas condiciones, pero sin plantas, para poder estimar la evaporación, y por diferencia de pesadas, poder inferir la transpiración.

En lapsos regulares entre los minutos 5 y 120 minutos, se extrajeron alícuotas de la solución nutritiva para evaluar la concentración remanente de P según se describió anteriormente (medición de P en soluciones nutritivas) y poder caracterizar la cinética de absorción de P por unidad de peso fresco de la raíz.

Para obtener el dato de peso fresco, las raíces fueron suavemente secadas con un papel absorbente y pesadas al finalizar el experimento.

### **3.10 Medición del pH en la solución nutritiva**

A fin de poder comparar la capacidad de modificar el pH del entorno rizosférico en la solución nutritiva por parte de las raíces de plantas, se transfirieron las plantas provenientes de los distintos tratamientos (con la solución nutritiva completamente renovada el día previo a la medición) a macetas de 300 ml conteniendo solución nutritiva idéntica a la solución de la cual provienen las plantas, pero en ausencia solución reguladora de pH MES. Antes de transferir las plantas estas soluciones, las raíces se enjuagaron durante 30 segundos en agua destilada a fin de eliminar el P débilmente unido a la superficie de la misma. En estas soluciones se midió el pH a tiempos regulares en el rango temporal de 0 a 240 minutos, a fin de detectar diferencias en el cambio del pH en este rango de tiempo. Una vez finalizado el tratamiento las raíces fueron secadas con papel absorbente y pesadas para poder expresar el cambio de pH en función de la biomasa de las mismas.

### **3.11 Determinaciones enzimáticas**

#### **3.11.1 Determinación la actividad de fosfatasas acidas en tejidos**

Los tejidos fueron homogeneizados en mortero sobre hielo, utilizando una relación de 1 g de tejido en 2 ml de solución reguladora Tris-HCl 50 mM pH 7, conteniendo  $\text{MgCl}_2$  3 mM, EDTA 1 mM, polivinilpirrolidona (PVP) 1%. El homogenato se centrifugó 20 min a 10000 *g* y 4°C para obtener el sobrenadante, el cual se separó en tubos *ependorff* y se almacenó en hielo hasta su medición. La determinación descrita por Clark (1975), se llevó adelante mezclando 0,15 ml de sobrenadante con 0,5 ml de buffer acetato de sodio 100 mM, pH 4,3, conteniendo p-nitrofenil fosfato (PNP) 2 mM. La mezcla de reacción se incubó en baño de agua a 37°C durante 3 min. Para finalizar la reacción, se agregaron 0,9 ml de NaOH 0,2 N. A modo de blanco, se realizó un duplicado para cada muestra en el cual los 0,9 ml de NaOH 0,2 N fueron agregados desde el comienzo, antes de la incubación para evitar la actividad enzimática durante la misma. La cuantificación se llevó adelante leyendo la absorbancia a 410 nm un espectrofotómetro, y el cálculo de la degradación de PNP a P-nitrofenol se realizó a través del coeficiente de extinción molar brindado por la empresa *Sigma* (para PNP), expresando la actividad enzimática como  $\mu\text{moles}$  de nitrofenol liberados por minuto bajo las condiciones arriba descritas. Los valores fueron expresados en función del contenido de proteínas determinadas de acuerdo con Bradford (1976) usando seroalbúmina bovina como estándar.

A fin de evaluar posibles efectos directos del GSNO sobre la actividad de fosfatasa ácida, se realizaron una serie de experimentos *in vitro* en los cuales homogeneizados de raíces provenientes de plantas controles y deficientes en P fueron incubados en presencia de GSNO. Los homogeneizados se realizaron a partir de raíces frescas, utilizando el mismo procedimiento descrito anteriormente, y se obtuvieron los sobrenadantes los cuales fueron conservados en hielo. Luego los sobrenadantes se incubaron en presencia de GSNO 10  $\mu\text{M}$  en hielo hasta 45 minutos y se tomaron alícuotas a distintos tiempos para medir la actividad de las enzimas fosfatasas, utilizando la técnica descrita más arriba.

### **3.11.2 Determinación la actividad de enzimas antioxidantes**

Para la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes los tejidos vegetales fueron homogeneizados en frío en solución reguladora de fosfato de potasio 50 mM pH 7, manteniendo una relación de 3 ml de solución por gramo de tejido. Una vez homogeneizadas, las muestras fueron centrifugadas a 10000 *g* y 4°C durante 20 minutos, para obtener los sobrenadantes

utilizados en los ensayos posteriores. Para la determinación de la actividad APX los homogeneizados fueron realizados en presencia de ácido ascórbico 0,5 mM.

#### **3.11.2.1 Determinación de la actividad ascorbato peroxidasa (APX)**

La medición se desarrolló en una mezcla de buffer fosfato de potasio 50 mM conteniendo 0,5 mM de ácido ascórbico,  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,1 mM y 25  $\mu\text{l}$  de muestra en un volumen final de 1 ml. Se midió el cambio en la absorbancia durante 1 minuto a  $\lambda=290$  nm, para calcular la actividad a partir del coeficiente de extinción molar del ácido ascórbico  $\epsilon= 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

En los mismos extractos utilizados para medir la actividad enzimática también se determinó el contenido de proteínas de acuerdo con Bradford (1976) para poder expresar la actividad enzimática en función de las mismas.

#### **3.11.2.2 Determinación de la actividad Superóxido dismutasa (SOD)**

La actividad SOD se cuantificó mediante la inhibición de la reducción del nitro blue tetrazolium (NBT) en presencia del sistema xantina-xantina oxidasa (Beauchamp y Fridovich, 1971). La mezcla de reacción estuvo integrada por NBT 0,1 mM, EDTA 0,1 mM, xantina 50  $\mu\text{M}$  y xantina oxidasa (XO) en buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7,5. Las unidades de XO utilizadas fueron las necesarias para generar una variación de 0,025 U de absorbancia por minuto. Una unidad de SOD es considerada como la cantidad de enzima que inhibe el 50% de la reducción de NBT.

En los mismos extractos donde se midió la actividad enzimática también se determinó el contenido de proteínas como se describió anteriormente, para poder expresar la actividad enzimática en función de las mismas.

#### **3.11.3 Determinación de la actividad nitrato reductasa (NR)**

La actividad NR se determinó utilizando la técnica “*in vivo*” descrita por Deane-Drummond y Clarkson (1979) . Dos secciones centrales de la hoja fueron cortadas, en forma de tiras de 5 mm de ancho (perpendicular a la nervadura central), pesadas, colocadas en un tubo eppendorff y

sumergidas en un medio de incubación (25 mg de hoja/ml de medio), conteniendo buffer fosfato de potasio 50 mM pH 8, propanol 1% (v/v) y  $\text{KNO}_3$  100 mM. Los tejidos se infiltraron colocando los tubos en campana de vacío durante 4 minutos. Este procedimiento se realizó al menos dos veces cuidando que todos los tejidos estuvieran cubiertos por el líquido. Luego, los tubos fueron incubados en baño de agua a 27°C durante 30 y 60 minutos en oscuridad, y para finalizar la reacción los mismos fueron puestos en contacto con agua en ebullición durante 10 minutos.

El nitrito presente en cada tubo se cuantificó haciendo reaccionar 0,5 ml del buffer de incubación, con 0,5 ml de sulfanilamida 1% P/V en HCl 3N y 0,5 ml de NED (N-1-naftil-etilendiamina diclorhidrato) 0,05% (P/V). La mezcla de reacción se dejó reposar 15 min y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 540 nm.

La curva de calibración se construyó empleando diferentes concentraciones de  $\text{NaNO}_2$  preparado en la misma solución empleada con las muestras, en un rango de concentraciones finales entre 0 y 1  $\mu\text{g/ml}$ . Los resultados fueron expresados como el nitrito generado (nmol) por minuto, medido en un rango entre 30 y 60 minutos de reacción.

### 3.12 Determinación del contenido de NO en tejidos

El contenido de NO se determinó mediante microscopia de fluorescencia empleando la sonda 4-aminometil-2',7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM-DA) (Buet y col., 2014; Galatro y col., 2013). Se realizaron cortes finos de tejido fresco utilizando micrótopo de mano que se incubaron durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente en solución reguladora Tris-HCl 10 mM pH 7,4 conteniendo 17  $\mu\text{M}$  de DAF-FM-DA. Finalizada la incubación, se lavaron durante 15 min en la misma solución sin DAF-FM-DA. Una vez enjuagadas, las muestras se montaron en portaobjetos para ser observados al microscopio de epifluorescencia (Olimpus BX51) o en microscopio confocal (Leica, modelo SP5) empleando seteo estándar para fluorescencia verde del DAF-FM ( $\lambda_{\text{excitación}}=488$  nm y  $\lambda_{\text{emisión}}=500-525$ ) y autofluorescencia de clorofila ( $\lambda_{\text{excitación}}=488$  nm y  $\lambda_{\text{emisión}}=670-730$  nm). Se estandarizaron los tiempos de exposición para la observación y la toma de las fotografías. Para descartar la existencia de autofluorescencia se realizaron cortes de tejido incubados en ausencia de la sonda fluorescente y en todos los casos la fluorescencia medida resultó casi indetectable. Las imágenes adquiridas se analizaron utilizando el programa ImageJ.

### 3.13 Determinación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en tejidos

Para detectar mediante el uso de microscopia de fluorescencia la presencia de especies reactivas del oxígeno se utilizó 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH DA) (Tyburski y col., 2009).

Cortes finos de hojas, realizados con micrótopo de mano, fueron incubados durante 30 minutos en oscuridad y temperatura ambiente en solución reguladora Tris/HCl 50 mM pH 7,4 conteniendo DCFH DA 50  $\mu$ M, y posteriormente enjuagados con la misma solución reguladora sin la sonda fluorescente durante 10 minutos. Los tejidos fueron observados empleando microscopio confocal de fluorescencia ( $\lambda_{\text{excitación}}$ =488 nm y  $\lambda_{\text{emisión}}$ =500-525). Se utilizaron como blanco secciones de hoja incubadas en el buffer sin DCFH DA para descartar la existencia de autofluorescencia.

### 3.14 Microscopia óptica de raíces

Se cortaron secciones de la raíz principal de 5 mm de longitud, distantes 1 cm del ápice, se colocaron en tubos eppendorf conteniendo 1ml de FAA (formaldehído-ácido acético-etanol) y se infiltraron durante 15 minutos en campana de vacío. Una vez fijadas las muestras se lavaron con buffer fosfato de potasio 50 mM y se deshidrataron en un gradiente de soluciones de alcohol etílico de 50, 60, 70, 80, 90 y 100% de alcohol en agua, para colocarlas finalmente en acetona. Posteriormente las muestras se infiltraron e incluyeron en resina Spurr durante 24 h a 70°C para su polimerización. En cada uno de los pasos previos se aplicó vacío suave.

Los cortes semifinos de 1 $\mu$ m de espesor se realizaron con un ultramicrotomo Leica EM UC7, se montaron en portaobjetos de vidrio y se colorearon con Azul de toluidina.

### 3.15 Determinación del contenido de proteínas

El contenido de proteínas de las muestras se determinó empleando el método de (Bradford, 1976), incorporando alícuotas de 5 o 10  $\mu$ l de las muestras en 1 ml de reactivo de Bradford. Se utilizó soroalbúmina bovina como estándar para realizar la curva de calibración.



### 3.16 Estudios de proteómica

Hojas de soja (0,5 g/ml) fueron homogeneizadas en urea 7 M, thiourea 2M, solución CHAPS 4% (P/V) y centrifugadas a 10000 *g*, por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue empleado para realizar los estudios subsiguientes. La cuantificación de las proteínas fue llevada adelante empleando análisis de densitometría en gel utilizando ImageQuant TL (GE Healthcare) y el kit de marcadores LMW-SDS como estándar. Veinte microgramos de cada muestra de proteínas (Control y restringidas en P por triplicado) fueron resueltas utilizando geles *pre-cast* (NuPAGE, MES System, Invitrogen) de gradiente 4-12%. Los geles fueron fijados en etanol 50% y ácido acético 10%, y luego teñidos durante toda la noche con solución coloidal de Coomassie brilliant blue (8% de sulfato de amonio, 0,8% (w/w) de ácido fosfórico, 0,08% Coomassie Blue G-250, 20% etanol). La concentración de proteínas fue determinada por densitometría en geles usando el módulo de análisis 1D del software ImageQuant TL (v8.1) (GE Healthcare), se utilizó como marcador y estándar para la cuantificación de proteínas el LMW-SDS Marker Kit (GE Healthcare).

Cada calle fue cortada en 8 partes y desteñida lavándola dos veces con bicarbonato de amonio/ acetonitrilo (1:1) 0,2 M a 30°C con agitación. Luego, cada fragmento de gel fue reducido con 10 mM DTT en bicarbonato de amonio 70 mM pH 8 a 56°C durante 60 minutos en agitación a 200 rpm y posteriormente alquilado con iodoacetamida 50 mM en el mismo *buffer* a temperatura ambiente durante 45 minutos a 200 rpm. Las muestras fueron lavadas dos veces con bicarbonato de amonio 0,2 M, deshidratadas mediante dos lavados con acetonitrilo bajo agitación vigorosa y posteriormente secadas en el aire dentro de una cabina de flujo laminar.

Las proteínas de las secciones de gel, fueron digeridas *in-gel* con tripsina (tripsina modificada de cerdo, Promega, Madison, WI, USA) en bicarbonato de amonio 70 mM pH 8, toda la noche a 37°C. Los fragmentos peptídicos resultantes fueron extraídos dos veces, con acetonitrilo 60% y ácido trifluoroacético 0,1% bajo agitación por 1 h a 30°C. Las muestras fueron secadas en vacío, disueltas en ácido fórmico al 0,1% por sonicación, centrifugadas a velocidad máxima por 30 minutos, y finalmente transferidas a viales para ser analizadas mediante nLC-ion trap MS.

El análisis de los péptidos fue llevado adelante en un equipo ion trap lineal LTQ Velos nano-ESI (Thermo Scientific). Las muestras de péptidos fueron inyectadas en un sistema nano-HPLC (EASY-nLC 1000, Thermo Scientific) equipado con una columna de fase-inversa (PepMap<sup>TM</sup>, RSLC, C18, 2 mm, 100 Å, 50 mm x 15 cm, Thermo Scientific) con un flujo de 250 nL/min. La separación de los péptidos se llevó adelante empleando un gradiente de 100 minutos (0% a 50% de 1% de ácido

fórmico en acetonitrilo). El espectrómetro de masas fue seteado en el modo de adquisición *data-dependent* con una lista de exclusión dinámica de 45 s. Los iones peptídicos fueron analizados con Xcalibur 2.1 en dos etapas: 1. Adquisición del escaneo total de MS en el modo iónico positivo con *m/z* entre 400 y 1200 Da, 2. Aislamiento secuencial y fragmentación de los diez iones más intensos con una energía de colisión normalizada de 35. El Q de activación fue seteado en 0,25 y el tiempo de activación en 15 milisegundos. Los parámetros estándar de MS fueron seteados de la siguiente manera: 2,3 kV de voltaje en electrospray y 260°C de temperatura de capilar.

El software PatternLab de Proteomics softwares (version 4.0.0.74) fue utilizado para generar una base de datos usando secuencias de *Glycine max* descargadas del uniprot en enero, 2018 (<http://www.uniprot.org>). Adicionalmente, 127 contaminantes comunes de la espectrometría de masas fueron incluidos. El *Comet search engine* fue utilizado usando los siguientes parametros: tripsina como enzima proteolítica con especificidad full, oxidación de metionina y tirosina como modificaciones variables, carbamidometilación como modificación fija, y 800 ppm de tolerancia para el precursor medido *m/z*. XCorr y Z-Score fueron utilizados como los scores de búsqueda primarios y secundarios, respectivamente (Carvalho y col., 2012b; Carvalho y col., 2016).

Los *match* del espectro peptídico fueron filtrados usando el Pattern Lab *Search Engine Processor* (SEPro). El criterio aceptable de *false discovery rate* (FDR) fué seteado en 1% del nivel de proteína (Carvalho y col., 2012a). Los resultados fueron procesados para filtrar los péptidos con más de 6 residuos aminoácidos y las proteínas con un mínimo de dos *spectrum matches*. El módulo PatternLab's *Approximately Area Proportional Venn Diagram* fue utilizado para llevar adelante comparaciones entre las dos condiciones y para determinar proteínas únicamente detectadas en uno de los tratamientos. Proteínas observadas en al menos dos replicas biológicas de cada condición, y a su vez ausentes en todas las réplicas de la otra condición, fueron consideradas como presentes únicamente en uno de los tratamientos. El modulo T-fold de PatternLab's fue utilizado para detectar proteínas presentes en ambas condiciones a niveles significativamente diferentes por análisis del conteo de espectros (diferente abundancia relativa de proteínas). Proteínas presentes en cuatro replicados de todas las muestras y que satisfacen los criterios de fold change y p-value fueron seleccionadas para los análisis posteriores (Carvalho y col., 2012c).

Además, las proteínas identificadas en este estudio fueron clasificadas en base a su función molecular o el proceso biológico en el que participan utilizando el sistema de clasificación PANTHER (Mi y col., 2016).

### **3.17 Análisis estadístico**

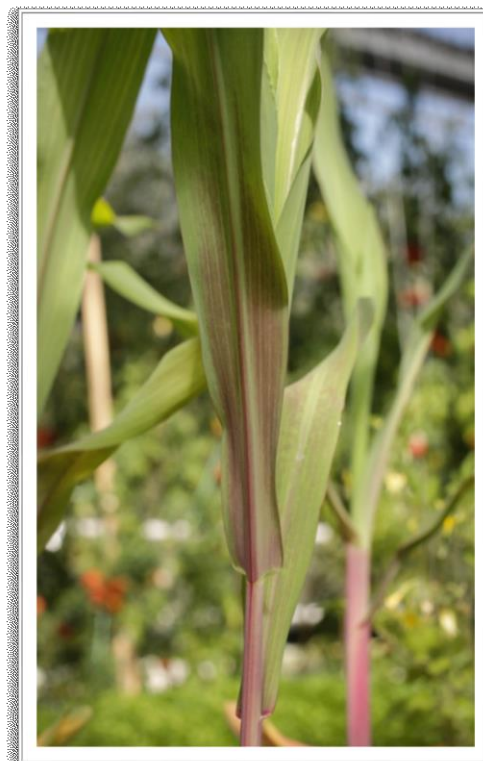
Los experimentos fueron analizados mediante un análisis ANOVA de una vía o factorial, o test t de Student, según corresponda al diseño del experimento. Y el análisis de significancia se desarrolló mediante el test de Tukey. Todos los análisis se llevaron adelante utilizando el programa STATISTICA (StatSoft).

# RESULTADOS

---



## Deficiencia de P en plantas de Maíz. Efecto de la exposición de las plantas a óxido nítrico (NO)

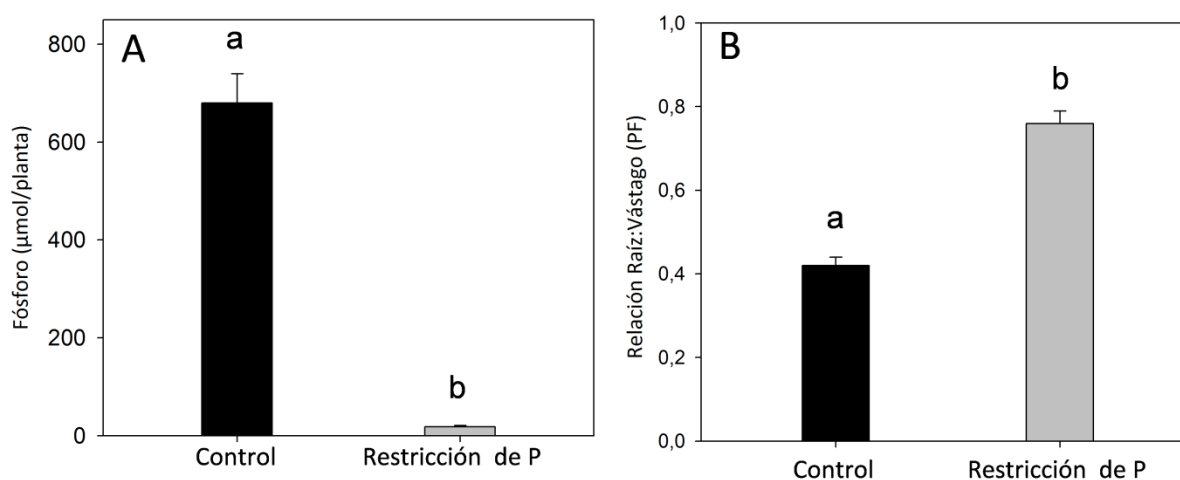


## 4.1 Deficiencia de P en plantas de Maíz. Efecto de la exposición de las plantas a óxido nítrico (NO)

Se presentan resultados obtenidos a partir del tratamiento de plantas de maíz cultivadas en hidroponía sometidas a dos niveles de concentración de P (0 y 0,5 mM) y dos niveles de tratamiento con GSNO (0 y 0,1 mM). Los tratamientos fueron aplicados durante 21 días, buscando obtener un establecimiento seguro de la deficiencia y poder medir como esto afectaba fisiológica y morfológicamente a la planta; y durante 6 días, momento en el cual se observó un 20% de diferencia en el crecimiento de las plantas testigo respecto a las restringidas en P, para determinar cuáles de las respuestas se desarrollan de manera más temprana (Figura 3.1).

### 4.1.1 Evaluación del contenido de P en plantas de maíz. Establecimiento y caracterización de la deficiencia de P

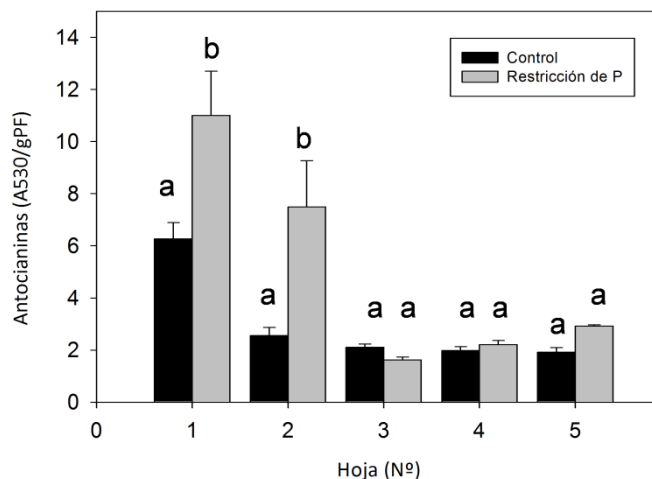
En primera instancia estudiamos el efecto de la privación de P, bajo las condiciones específicas de este ensayo, sobre algunos parámetros fisiológicos y morfológicos de las plantas de maíz. A los 21 días de comenzado el tratamiento con dos concentraciones de P (0 y 0,5 mM), el contenido de este nutriente en los tejidos se vio severamente reducido en las plantas en condición de restricción nutricional (Figura 4.1 A), y se observó un cambio significativo en la relación de biomasa expresada como cociente del peso fresco de las raíces y el vástago (Figura 4.1 B).



**Figura 4.1.** Efecto de la privación de P a largo plazo (21 días) en plantas de maíz. Las plantas de 8 días desde el inicio de la germinación fueron cultivadas durante 21 días en solución nutritiva con dos niveles de fosfato 0 y 0,5mM. **A.** Contenido de P en la planta entera expresado en  $\mu\text{moles}$  por planta. **B.** Relación del Peso

fresco raíz: Peso fresco vástago. Las letras representan diferencias significativas entre tratamientos según el test t de Student ( $p < 0,05$ ) y las barras de error representan el error estándar.

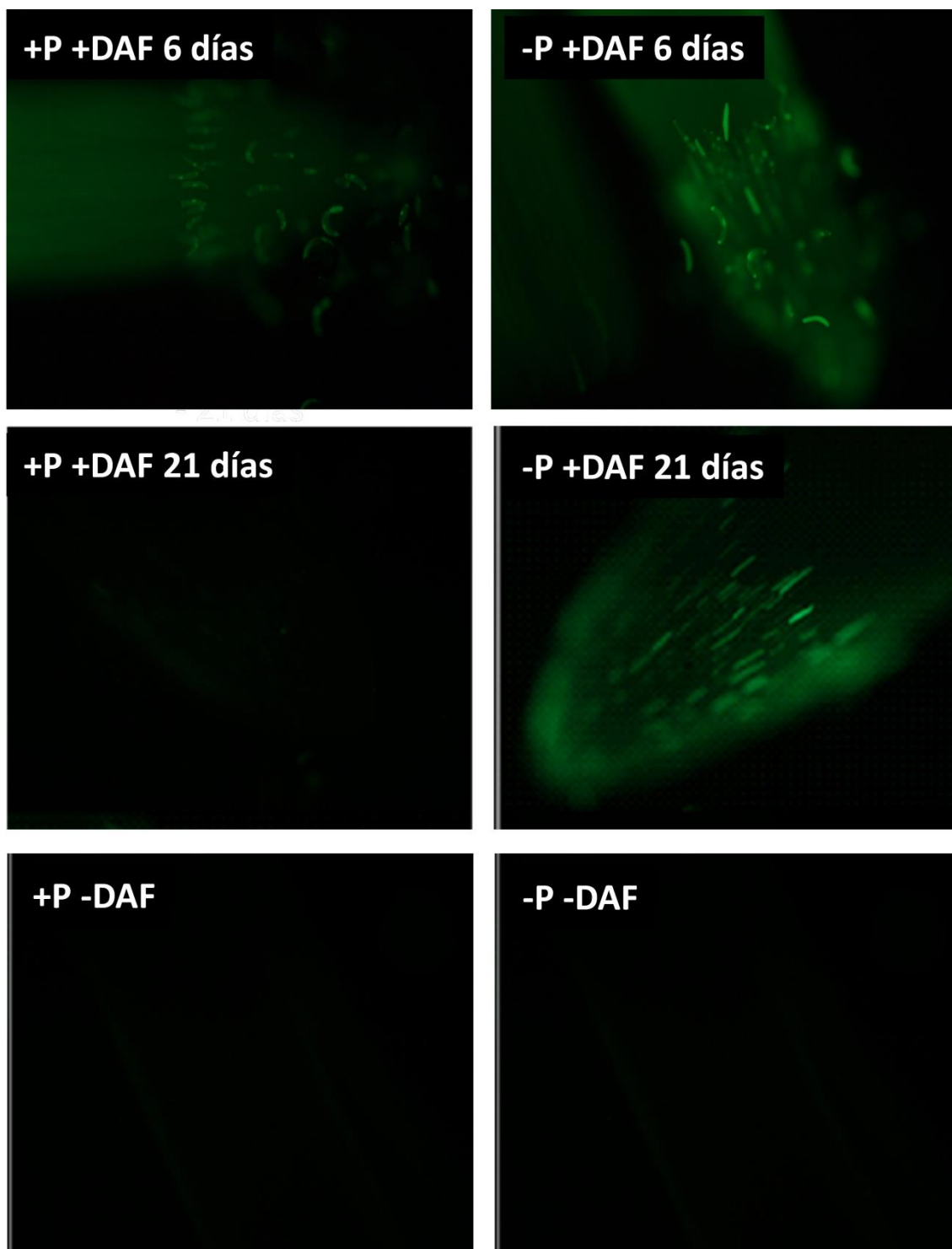
Los síntomas de deficiencia de P en las plantas expuestas a déficit de dicho nutriente durante 21 días también se hicieron evidentes en la acumulación de antocianinas en las hojas más viejas (la primera y la segunda) (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** El contenido de antocianinas se evaluó en todas las hojas totalmente desplegadas a los 21 días de tratamiento en plantas controles (0,5 mM) y restringidas (0 mM) en P, y se expresa como unidades arbitrarias (UA). Las letras representan diferencias significativas entre medias según el test t de Student ( $p < 0,05$ ) y las barras de error representan el error estándar.

#### 4.1.2. Evaluación del contenido de NO endógeno

Con el fin de evaluar los niveles endógenos de NO se realizaron cortes de raíces provenientes de plantas controles y plantas deficientes en P que se incubaron en la sonda fluorescente DAF-FM DA. Se observó un incremento de la fluorescencia, que evidencia la mayor presencia de NO, en los ápices de las raíces de las plantas sometidas a 21 días de déficit de P (Figura 4.3). Se realizaron controles en muestras de tejidos incubados en ausencia de la sonda fluorescente DAF-FM DA, para descartar la presencia de autofluorescencia en los tejidos. En ningún caso se observó autofluorescencia significativa.



**Figura 4.3.** Detección de NO empleando la sonda fluorescente DAF-FM DA en ápices de raíces de plantas de maíz luego de 6 y 21 días de tratamiento en condiciones controles (+P +DAF) y de déficit de P (-P +DAF). Ápices de raíces de plantas de maíz incubados en ausencia de DAF-FM DA se utilizaron como control de autofluorescencia de los tejidos (+P-DAF y -P -DAF).



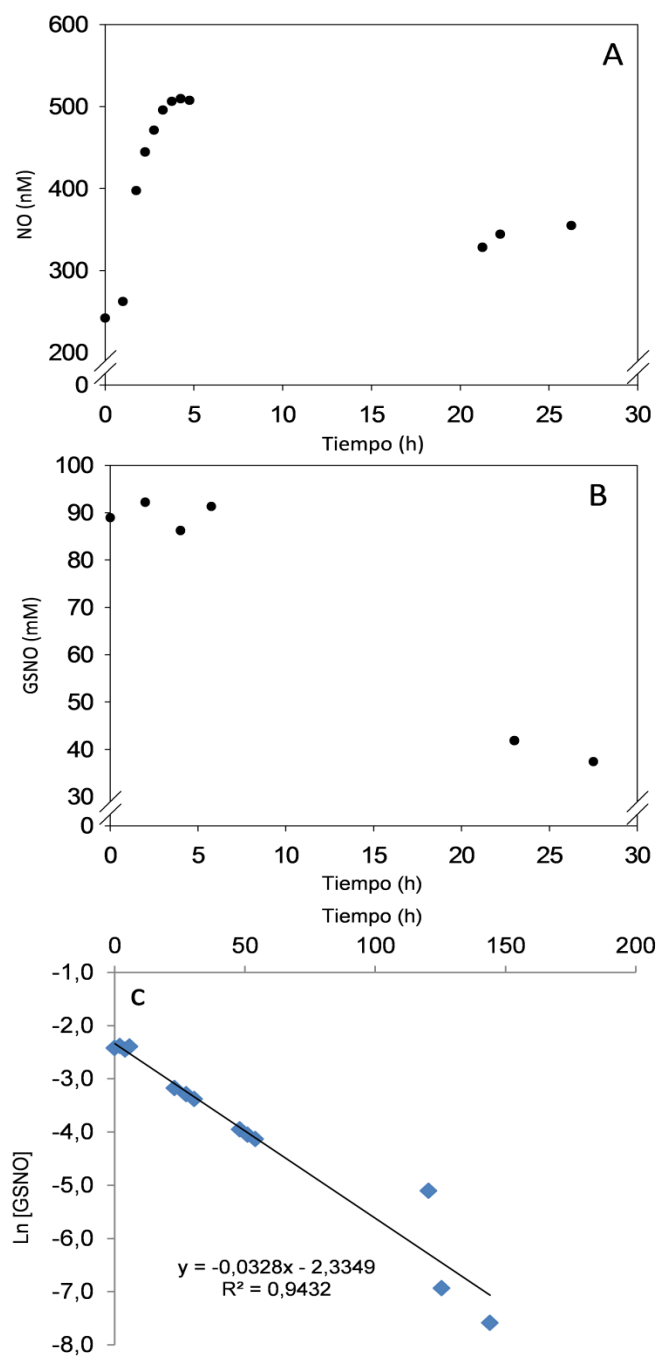
### 4.1.3 Exposición de las plantas de maíz a un dador de NO

#### 4.1.3.1 Caracterización de la liberación de NO por el GSNO en condiciones de cultivo

A fin de evaluar si el NO puede afectar el comportamiento de las plantas de maíz sometidas a déficit de P, se empleó un dador de NO, el s-nitrosoglutation (GSNO) en concentración 0,1 mM, el cual fue incorporado a la solución nutritiva en el mismo momento que se impuso a las plantas el tratamiento de déficit de P (día 8 desde inicio de germinación). El tratamiento con GSNO fue aplicado cada 4 días, junto con la renovación de la solución nutritiva.

Para caracterizar la dinámica de liberación de NO por parte del GSNO en la solución nutritiva, se siguió una metodología previamente empleada en nuestro laboratorio (Buet y col., 2014), mediante el uso de un electrodo selectivo para la detección de NO. La incorporación de 1 ml de solución stock de GSNO 100 mM por litro de solución nutritiva para alcanzar la concentración de GSNO 0,1 mM en la solución nutritiva utilizada en los experimentos, da lugar a la liberación de NO en las horas subsiguientes, alcanzándose una concentración máxima de NO de 0,5  $\mu$ M en la solución entre las 4 y las 5 h (Figura 4.4 A), para luego comenzar a decaer. Estos resultados concuerdan con la medición llevada adelante directamente sobre el decaimiento de la concentración de GSNO en la solución stock 100 mM de GSNO (Figura 4.4 B), evaluada espectrofotométricamente. También se corroboró que el agregado de GSNO no altera el pH de la solución nutritiva en el momento de ser incorporado.

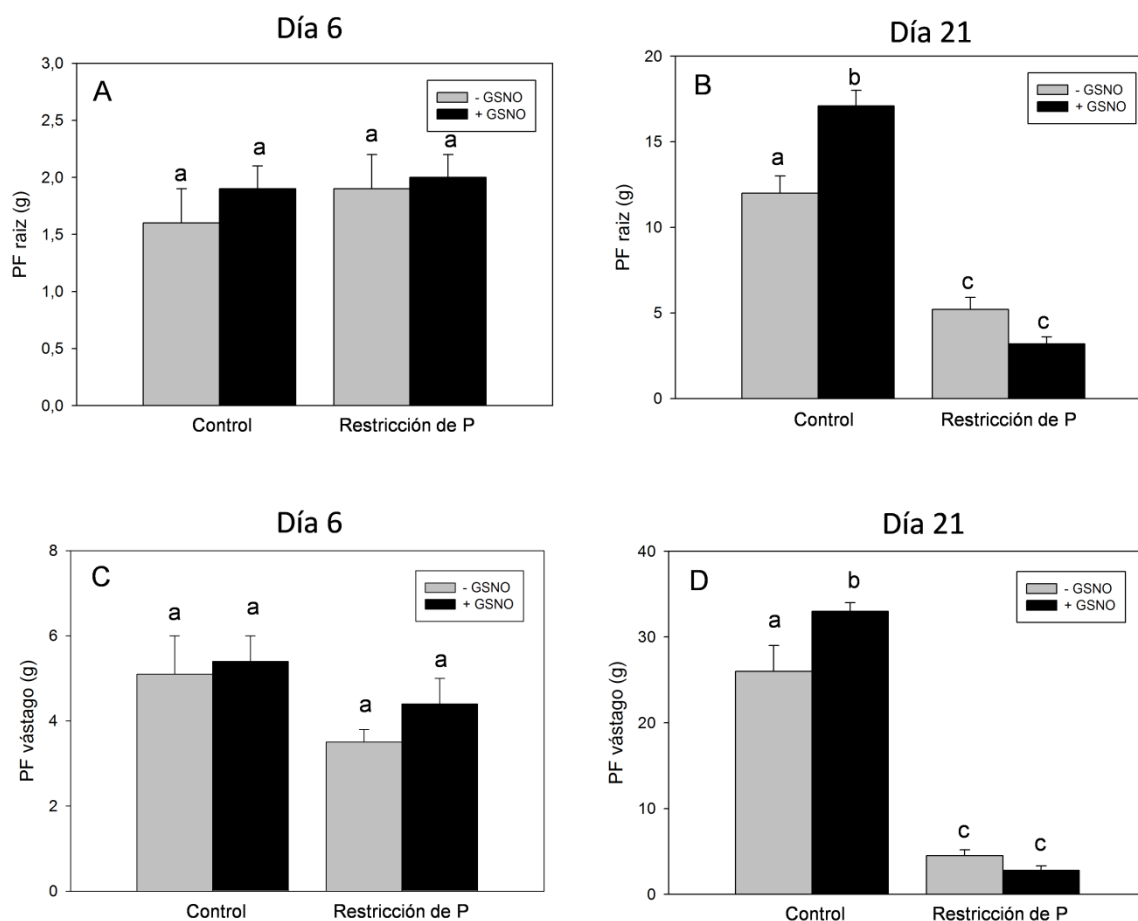
Para garantizar la degradación del GSNO que se utilizó como tratamiento en algunos de los experimentos a fin de descartar que alguno de los cambios observados sea generado por compuestos secundarios de la degradación del GSNO, se mantuvo el compuesto durante 7 días en condiciones de luz y temperatura ambiental, tiempo equivalente a 7,7 vidas medias (constante de primer orden = 0,032 h<sup>-1</sup>,  $t_{1/2}$  = 21,6 h, Figura 4.4 C). En la solución obtenida de GSNO degradado (GSNO<sub>d</sub>), se evaluaron además las concentraciones de las formas oxidadas (GSSG) y reducidas (GSH) de glutatión, obteniendo una relación [GSSG]/[GSSG+GSH] de 1,00  $\pm$  0,02, lo cual sugiere que la concentración de GSH resulta despreciable luego del proceso de degradación del GSNO.



**Figura 4.4.** Liberación de NO por el GSNO en las condiciones de cultivo. **A.** El GSNO fue incorporado a la solución nutritiva en una concentración final de 0,1 mM y la liberación de NO fue medida utilizando el electrodo (WPI ISO NO Mark II) selectivo para NO en las mismas condiciones de aireación y oscuridad empleadas en el cultivo de las plantas. **B.** El decaimiento de la solución stock de GSNO desde un valor inicial de 100 mM fue seguido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 335 nm, utilizando el coeficiente de extinción molar  $\epsilon = 922 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . **C.** Descomposición de primer orden del GSNO. La absorbancia a  $\lambda=335 \text{ nm}$  de la solución stock de GSNO 100 mM fue monitoreada y expresado el decaimiento de su concentración en función del tiempo utilizando el coeficiente de extinción  $922 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.1.3.2 Efecto de la exposición a NO sobre el crecimiento y el contenido de P

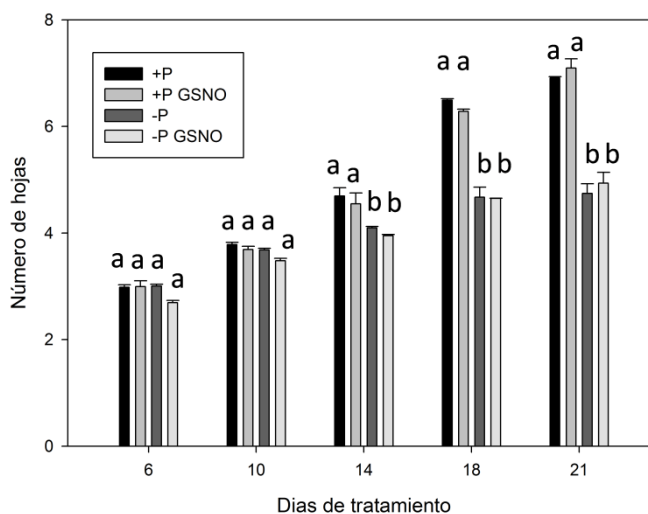
Los efectos del NO sobre la modulación del crecimiento de las plantas comenzaron a describirse hace años (Beligni y Lamattina, 2000). En lo referente a los cambios en la acumulación de biomasa bajo las condiciones experimentales empleadas en este trabajo se observó una mayor acumulación en el vástago y la raíz de plantas controles luego de un periodo prolongado de exposición al NO (Figura 4.5 B y D).



**Figura 4.5.** Efecto de la restricción de P y la exposición a GSNO en la acumulación de biomasa. Plantas de 8 días de vida desde el inicio de la germinación, fueron cultivadas en solución nutritiva, bajo dos concentraciones de P (0 y 0,5 mM), y dos concentraciones de GSNO (0 y 0,1 mM). El peso fresco fue evaluado en **A.** Raíces de plantas con 6 días de tratamiento, **B.** Raíces de plantas con 21 días de tratamiento, **C.** Vástago de plantas con 6 días de tratamiento y **D.** Vástago de plantas con 21 días de tratamiento. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar, los datos fueron analizados utilizando el ANOVA de dos vías y el Post Hoc test de Tukey. Las diferentes letras expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

Sin embargo, en condiciones de déficit de P la biomasa no resultó afectada. La relación raíz/vástago no fue significativamente afectada por la exposición a NO ni en condiciones de déficit de P ( $0.82 \pm 0.05$  y  $0.76 \pm 0.03$ , para plantas expuestas y no expuestas al GSNO, respectivamente), ni en condiciones de suficiencia de P ( $0.45 \pm 0.04$  y  $0.42 \pm 0.02$  para plantas expuestas y no expuestas al GSNO, respectivamente).

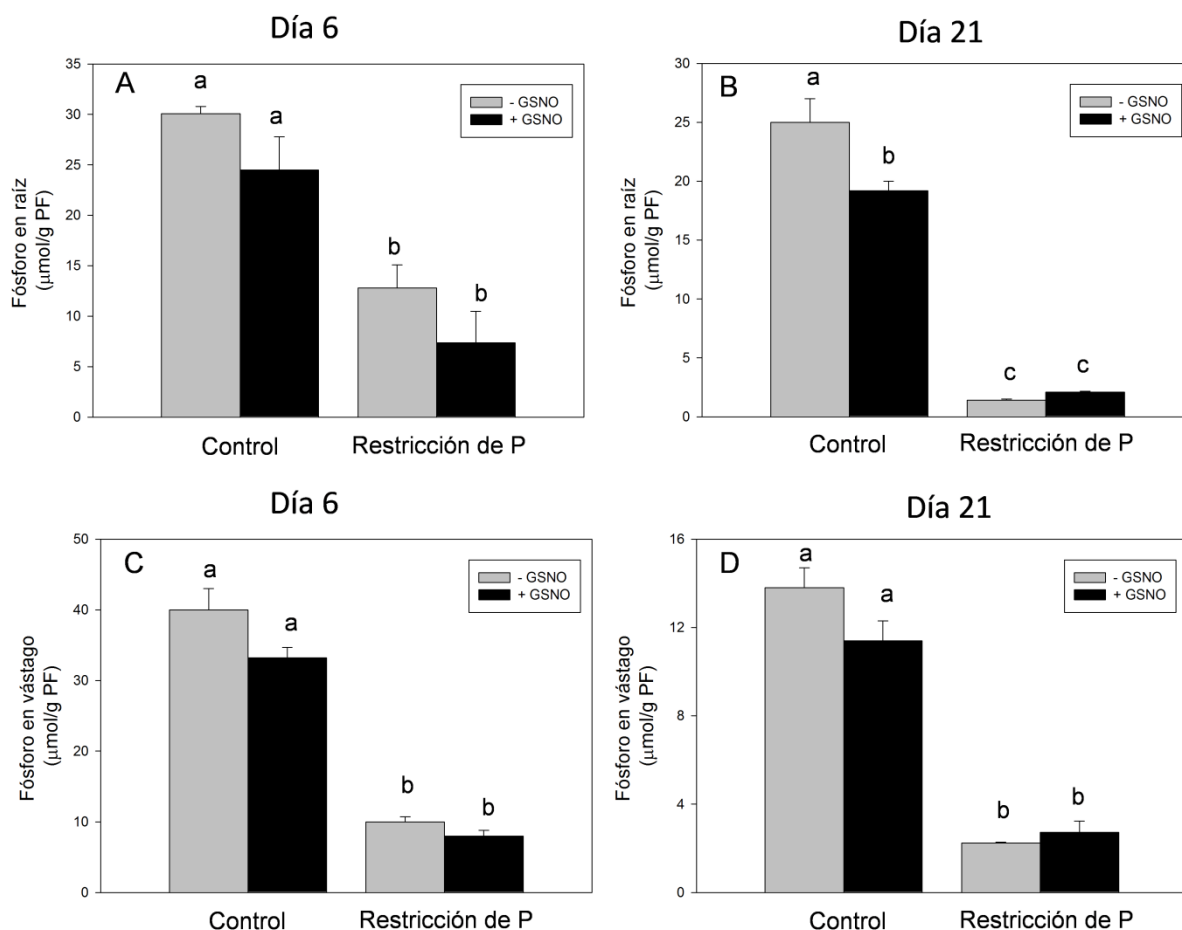
La evaluación de la aparición de las hojas en función del tiempo (filocrono), evidenció el efecto del déficit de P a partir del día 14 de tratamiento, mientras que el agregado de GSNO como dador de NO no afectó la tasa de generación de nuevas hojas durante los 21 días de tratamiento (Figura 4.6).



**Figura 4.6.** Efecto de la restricción de P y la presencia de un dador de NO sobre la tasa de aparición de hojas (filocrono). Plantas de 8 días de edad desde el inicio de la germinación fueron sometidas durante 21 días a dos niveles de P (0 y 0,5 mM) y dos niveles de GSNO (0 y 0,1 mM). La tasa de aparición de hojas fue evaluada tal cual se describe en materiales y métodos. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar, los datos fueron analizados utilizando el ANOVA de dos vías y el Post Hoc test de Tukey. Las letras diferentes expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

La concentración de P en el vástago y las raíces decae como consecuencia de la falta de incorporación de P desde la solución nutritiva y la consiguiente dilución de la concentración inicial de P presente en las plantas al momento de iniciarse el tratamiento a medida que la planta crece. La presencia de NO aportado exógenamente no afectó la concentración de P en las raíces o vástagos de las plantas en condición de déficit. Sin embargo, una reducción significativa en la concentración de P en la raíz fue observada para las plantas control expuestas al dador de NO sólo a los 21 días de tratamiento (Figura 4.7). Esta reducción se correlaciona con el efecto que el GSNO

generó en la promoción del crecimiento de las raíces luego de una prolongada exposición al tratamiento (Figura 4.5); ya que el contenido total de P no se modificó en las raíces independientemente de su exposición o no al dador de NO ( $303 \pm 28$  y  $327 \pm 18 \mu\text{mol P raíz}^{-1}$ , para plantas controles expuestas o no al GSNO por 21 días respectivamente).



**Figura 4.7.** Efecto de la restricción de P y la presencia de un dador de NO sobre la concentración de P en raíz y vástago. Plantas de 8 días de edad desde el inicio de la germinación fueron sometidas durante 6 y 21 días a dos niveles de P (0 y 0,5 mM) y dos niveles de GSNO (0 y 0,1 mM). La concentración de P fue evaluada en **A.** Raíces de plantas con 6 días de tratamiento, **B.** Raíces de plantas con 21 días de tratamiento, **C.** Vástago de plantas con 6 días de tratamiento y **D.** Vástago de plantas con 21 días de tratamiento. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar, los datos fueron analizados utilizando el ANOVA de dos vías y el Post Hoc test de Tukey. Las letras diferentes expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

La distribución del P entre las hojas fue evaluada en plantas de maíz luego de 21 días de privación de P. El contenido de P se determinó en la hoja completa (vaina + lámina), y se observó en todos los casos una caída en la concentración de P en las plantas sometidas a restricción de P, que fue

más acentuada en las hojas más viejas, sobre todo la primera y segunda hoja, que en las más jóvenes (Tabla 4.1). Estos datos sugieren una posible remobilización de P desde las hojas más viejas hacia las hojas más nuevas bajo condiciones de déficit nutricional. No se observaron cambios significativos en el patrón de acumulación de P en las hojas que puedan ser atribuibles al tratamiento con GSNO.

Tratamientos		P ( $\mu\text{mol g}^{-1}\text{PF}$ )				
P	GSNO	Hoja 1	Hoja 2	Hoja 3	Hoja 4	Hoja 5
+	-	22±8a	41±3a	31±2 <sup>a</sup>	24±4a	28±3a
+	+	13±4a	41±2a	32±1 <sup>a</sup>	27±8a	27±3a
-	-	1,4±0,2b (↓93%)	2,6±0,1b (↓94%)	3,6±0,6b (↓88%)	5,8±0,2b (↓76%)	9,0±0,8b (↓68%)
-	+	1,3±0,3b	3,1±0,2b	3,8±0,05b	6,3±0,5b	9,7±0,5b

**Tabla 4.1.** Distribución del fósforo en las hojas de maíz. Plantas de 8 días de edad desde el inicio de la germinación fueron sometidas durante 21 días a dos niveles de P (0 y 0,5 mM) y dos niveles de GSNO (0 y 0,1 mM). Los datos entre paréntesis expresan el porcentaje de decaimiento en la concentración de P para plantas sometidas a déficit en relación a plantas controles. Los números expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar, los datos fueron analizados utilizando el ANOVA de dos vías y el Post Hoc test de Tukey. Las letras diferentes expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.3.3 Efecto de la exposición a NO sobre la eficiencia de utilización de P

A fin de caracterizar variaciones en la eficiencia de uso del P (EPU) en los tratamientos aplicados, se utilizaron los criterios para calcular las EPU en sus formas estáticas y dinámicas de acuerdo a Santa-Maria y Moriconi (2015), según se describe en la sección materiales y métodos. Estos índices intentan reflejar la eficiencia con la cual la planta es capaz de acumular biomasa en forma relativa a la cantidad de P presente en la misma.

Como se muestra en la tabla 4.2, cuatro indicadores, denominados EPU<sub>o</sub>, EPU<sub>u</sub>, EPU<sub>i</sub> y EPU<sub>e</sub> fueron calculados en las plantas sometidas a deficiencia de P con o sin agregado de GSNO en la solución nutritiva. Las distintas EPU fueron calculadas solo para las plantas en situación de déficit, ya que según definen Moriconi y Santa-María (2013), no existe un sentido fisiológico para calcular la eficiencia con un recurso que la planta dispone en exceso.

Las diferentes definiciones de EPU permiten alcanzar interpretaciones estáticas (EPU<sub>o</sub> y EPU<sub>u</sub>) y dinámicas que contemplen la variable tiempo (EPU<sub>i</sub> y EPU<sub>e</sub>) del uso del P. A la hora de definir la EPU es importante no olvidar que las diferentes definiciones presentan restricciones propias en

relación a la información que brindan, y que la incorporación de las definiciones dinámicas nos permiten una mayor posibilidad de comprensión de la respuesta de las plantas al déficit de P (Santa-María y Moriconi, 2015).

Se observó una pequeña pero significativa reducción en la eficiencia del uso del P en la planta entera cuando las mismas fueron sometidas al tratamiento con GSNO. Este dato es coincidente con la leve tendencia a la reducción, aunque no significativa, en la acumulación de biomasa que se observa tanto en la raíz como en el vástago (Figura 4.5) para las plantas expuestas a deficiencia de P (21 días) en presencia de GSNO, en relación a las plantas creciendo sin GSNO agregado.

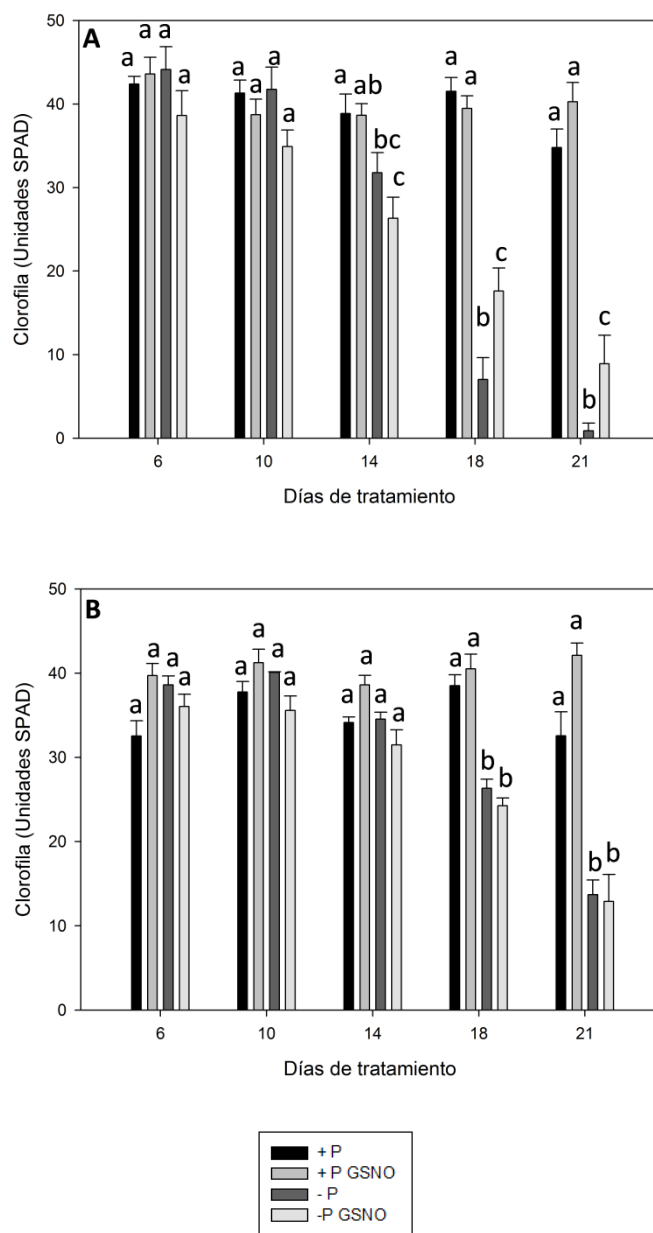
Tratamiento	EPUo (g $\mu\text{mol}^{-1}$ )	EPUu (g <sup>2</sup> $\mu\text{mol}^{-1}$ )	EPUi (g $\mu\text{mol}^{-1}$ d <sup>-1</sup> )	EPUe ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ d <sup>-1</sup> )
-P	0.187 $\pm$ 0.009	0.14 $\pm$ 0.01	0.0066 $\pm$ 0.0003	0.0122 $\pm$ 0.0008
-P + GSNO	0.175 $\pm$ 0.008	0.10 $\pm$ 0.01*	0.0054 $\pm$ 0.0004*	0.009 $\pm$ 0.001*

**Tabla 4.2.** Efecto del GSNO sobre los indicadores de EPU en plantas de maíz privadas de P. Plantas de 8 días de edad desde el inicio de la germinación fueron sometidas durante 21 días a déficit de P (0mM) y dos niveles de GSNO (0 y 0,1 mM). Los indicadores de EPU fueron evaluados en la planta entera. Los valores en la tabla expresan el valor medio  $\pm$  error estándar. Los datos fueron analizados utilizando el test t de Student ( $p < 0,05$ ). Los asteriscos expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos.

#### 4.1.3.4 Efecto de la exposición a NO sobre la fotosíntesis

Con el fin de analizar el efecto de la adición de GSNO sobre parámetros asociados a la fotosíntesis en plantas con adecuado y deficiente suministro de P, se llevó adelante un *screening* temporal de las hojas más jóvenes mediante el método no destructivo (SPAD), para observar la evolución de los niveles de clorofila en las hojas a lo largo del tratamiento. Las mediciones se efectuaron en las hojas 1 y 2, ya que eran las únicas hojas totalmente expandidas al inicio de las mediciones, 6 días después de la aplicación de los tratamientos.

En la hoja 1 a partir del día 14 de tratamiento ya se observa una diferencia significativa en la lectura del SPAD entre las plantas con restricción y suficiencia de P (Figura 4.8 A), mientras que en la hoja 2 la diferencia producto de los tratamientos recién cobra significancia a partir del día 18 (Figura 4.8 B).



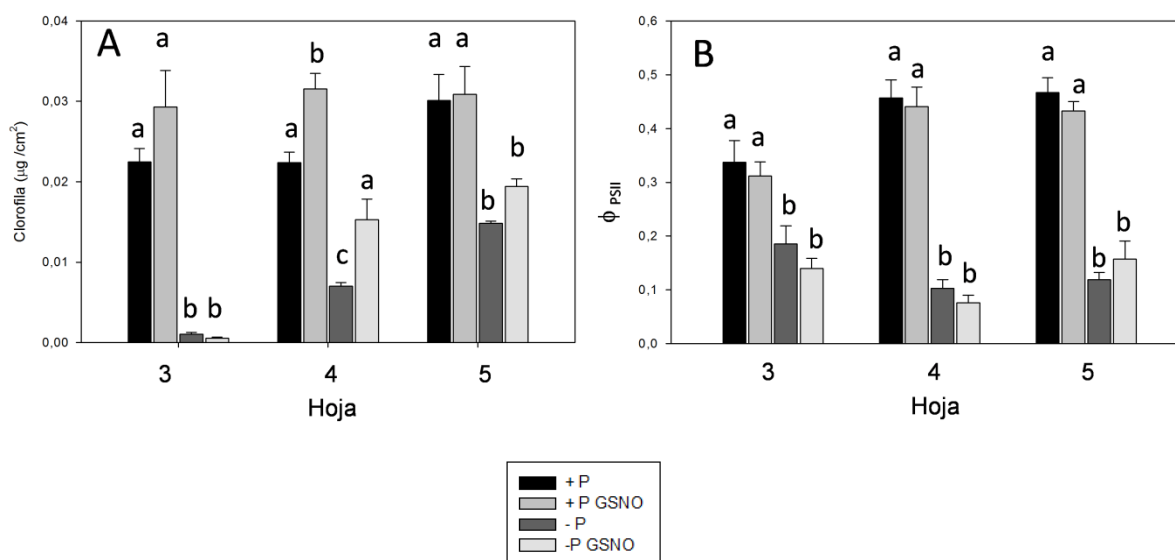
**Figura 4.8.** Efecto de la restricción de P y un dador de NO en el contenido de clorofila evaluado empleando SPAD. Plantas de 8 días de edad desde el inicio de la germinación fueron sometidas durante 21 días a dos niveles de P (0 y 0,5 mM) y dos niveles de GSNO (0 y 0,1 mM). **A.** hoja 1; **B.** hoja 2. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar, los datos fueron analizados utilizando el ANOVA de dos vías y el Post Host test de Tukey. Las letras diferentes expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

En relación al tratamiento con GSNO, no se observó un efecto significativo sobre los valores de SPAD hasta que la senescencia se encontró en un grado avanzado, recién en las mediciones en la hoja 1, efectuadas al día 18 y 21 de tratamiento, se pudo evidenciar una tendencia a incrementar



el contenido de clorofila con respecto a la planta que recibió el mismo tratamiento en ausencia de GSNO.

El contenido de clorofila se evaluó también en la lámina de las hojas empleando el método de extracción en dimetilformamida (Figura 4.9 A) en el momento de la cosecha, y se estimó el rendimiento cuántico del fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) (Figura 4.9 B) empleando un fluorímetro. El déficit de fósforo se tradujo en una caída significativa del contenido de clorofila en las hojas más viejas de la planta, siendo prácticamente indetectable para la hoja 1 y 2. En relación al efecto del tratamiento con GSNO, empleando esta metodología experimental, se observó que el nivel de clorofila en la cuarta hoja resultó significativamente superior cuando las plantas sometidas a deficiencia de fósforo también fueron expuestas a GSNO, alcanzando valores similares a aquellos obtenidos para las plantas controles. En las plantas controles, también pudo observarse en la hoja 4 un aumento de la cantidad de clorofila cuando las mismas fueron tratadas con GSNO.



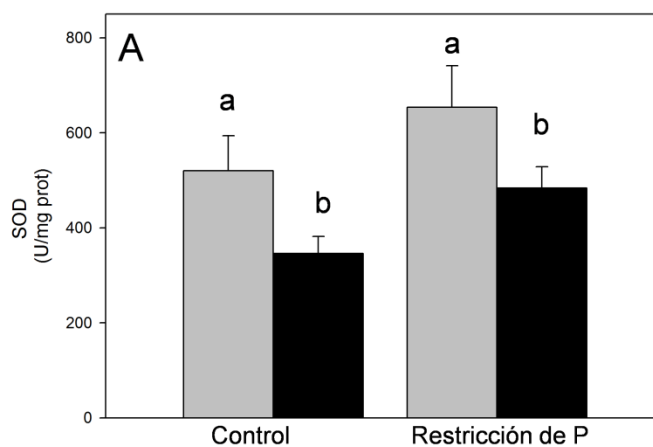
**Figura 4.9.** Efecto de un dador de NO sobre el contenido de clorofila y en el rendimiento cuántico del fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ). Plantas de 8 días de edad desde el inicio de la germinación fueron sometidas durante 21 días a dos niveles de P (0 y 0,5 mM) y dos niveles de GSNO (0 y 0,1 mM). **A.** La concentración de clorofila fue evaluada según se describe en materiales y métodos empleando la técnica de extracción en dimetilformamida. **B.** El  $\Phi_{PSII}$  fue evaluado en las hojas totalmente expandidas. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar, los datos fueron analizados utilizando el ANOVA de dos vías y el Post hoc test de Tukey. Las letras diferentes expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

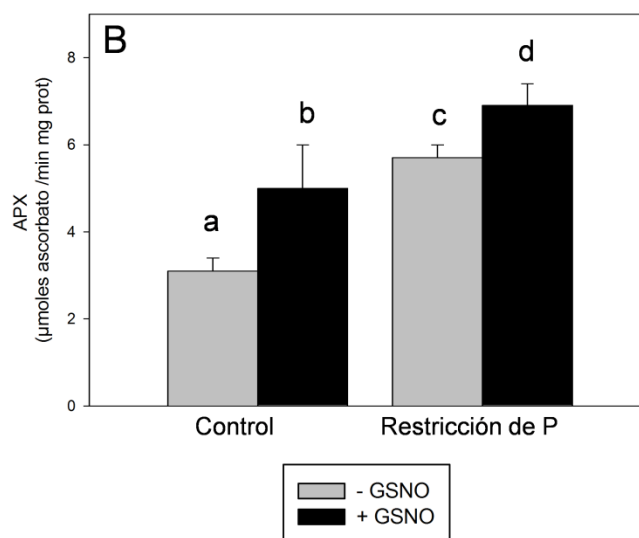
El efecto generado por el GSNO sobre el contenido de clorofila no tuvo un efecto equivalente en el  $\Phi_{PSII}$ . El  $\Phi_{PSII}$  decayó en las plantas sometidas a déficit de P un 44, 78 y 74% para las hojas 3, 4 y 5

respectivamente en relación a las plantas controles, y la presencia de GSNO no afectó significativamente en ningún caso este parámetro asociado a la funcionalidad cloroplástica.

#### 4.1.3.5 Efecto de la exposición a NO sobre las actividades enzimáticas antioxidantes

Es conocido que el NO puede afectar las respuestas de las enzimas antioxidantes bajo condiciones de estrés abiótico modificando tanto los niveles de expresión como la actividad (Santa-Cruz y col., 2014, Ortega-Galisteo y col., 2012; Holzmeiste y col., 2014). Dentro de las respuestas antioxidantes enzimáticas se evaluó la actividad de las enzimas SOD y APX en las raíces de las plantas de maíz. La actividad de la enzima SOD (Figura 4.10 A) no fue afectada por la escasez de P. Sin embargo, la exposición a GSNO durante el crecimiento redujo significativamente la actividad tanto para las plantas sometidas a déficit como para las que se encontraban bajo suministro apropiado de P. La actividad de la enzima APX, se vio incrementada como consecuencia del déficit de P, y la exposición a GSNO resultó en un incremento de la actividad tanto en las plantas sometidas a déficit, como en las plantas con adecuado suministro de P (Figura 4.10 B).

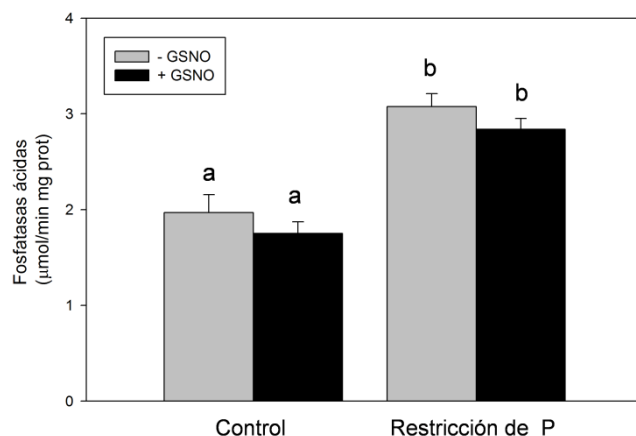




**Figura 4.10.** Efecto del dador de NO, GSNO, en la actividad de enzimas antioxidantes en plantas con suministro apropiado y con déficit de P. Plantas de 8 días de edad desde el inicio de la germinación fueron sometidas durante 21 días a dos niveles de P (0 y 0,5 mM) y dos niveles de GSNO (0 y 0,1 mM). La actividad de las enzimas **A.** Superóxido dismutasa (SOD) y **B.** Ascorbato peroxidasa (APX) fue cuantificada en raíces según se describe en materiales y métodos. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  error el error estándar. Los datos fueron analizados utilizando el ANOVA de dos vías y el Post Hoc test de Tukey. Las letras diferentes expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

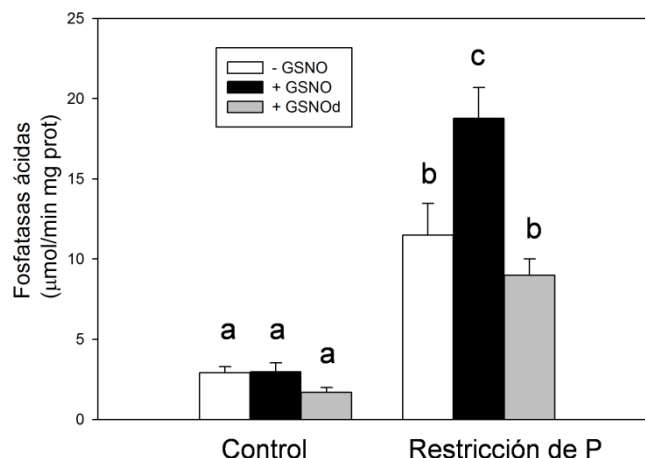
#### 4.1.3.6. Efecto de la exposición a NO sobre algunas respuestas típicas de adaptación a la deficiencia de P

Una de las respuestas más ampliamente descrita de las plantas frente al déficit de P está dada por la modificación de la actividad de las enzimas fosfatasas ácidas. En nuestros experimentos, observamos que en las plantas expuestas a situación de déficit de P se incrementó significativamente la actividad de las enzimas fosfatasas ácidas en raíz en comparación a las plantas en condiciones de suficiencia de P, a partir del día 6 de tratamiento (Figura 4.11). No obstante en estas condiciones (día 6) no se observó efecto significativo producto de la exposición a GSNO para ninguno de los niveles de suministro de P.



**Figura 4.11.** Efecto del dador de NO, GSNO, sobre la actividad de las enzimas fosfatasas ácidas en plantas en condiciones de suficiencia o deficiencia de P. Plantas de 8 días de edad desde el inicio de la germinación fueron sometidas durante 6 días a dos niveles de P (0 y 0,5 mM) y dos niveles de GSNO (0 y 0,1 mM). La actividad de las enzimas fosfatasas ácidas se midió en extractos de raíz según se describe en materiales y métodos. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar. Los datos fueron analizados utilizando el ANOVA de dos vías y el Post Hoc test de Tukey. Las letras diferentes expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

Luego de 21 días de tratamiento, además de observarse un incremento significativo de la actividad de las enzimas fosfatasas ácidas en las plantas sometidas a déficit de P, también se observó un efecto inducido por el tratamiento con GSNO, que incrementó significativamente la actividad de las mismas únicamente en las raíces de las plantas sometidas a déficit de P, no observándose efecto sobre la actividad de las enzimas fosfatasas en raíces de plantas en condiciones de suficiencia de P (Figura 4.12). A fin de asegurar que el efecto observado por el tratamiento con GSNO es causado por el NO liberado y no por algún compuesto secundario derivado del proceso de degradación del dador, se llevó adelante un tratamiento adicional de las plantas empleando GSNO degradado.



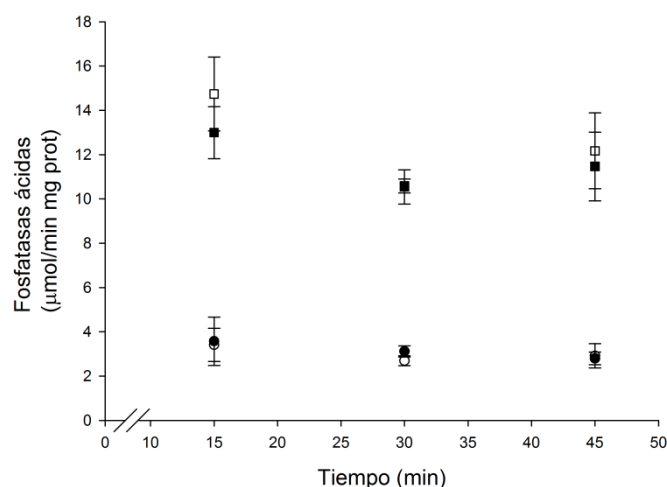
**Figura 4.12.** Efecto del dador de NO, GSNO, en la actividad de las enzimas fosfatasas ácidas en plantas de maíz sometidas a condiciones de suficiencia o deficiencia de P. Plantas de 8 días de edad desde el inicio de la germinación fueron sometidas durante 21 días a dos niveles de P (0 y 0,5 mM) y dos niveles de GSNO (0, y 0,1 mM). Se efectuó además un control adicional tratando a las plantas con GSNO previamente degradado (0,1 mM), según se indicó previamente. La actividad de las enzimas fosfatasas ácidas se midió en extractos de raíz según se describe en materiales y métodos. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar. Los datos fueron analizados utilizando el ANOVA de dos vías y el Post Hoc test de Tukey. Las letras diferentes expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

Una consideración importante en relación a la actividad de las enzimas fosfatasas ácidas aquí descritas es el hecho de que el contenido de proteínas solubles en las raíces de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos no se vio modificado, manteniéndose las mismas diferencias en la actividad cuando la misma fue expresada en función del peso fresco (PF) o en función de las proteínas (Tabla 4.3).

Tiempo de tratamiento (d)	P	GSNO	Proteínas solubles (mg g <sup>-1</sup> PF)	Fosfatasas ácidas (μmol min <sup>-1</sup> g <sup>-1</sup> PF)
21	+	-	1,26±0,03 <sup>a</sup>	1,0±0,2a
21	+	+	1,3±0,1 <sup>a</sup>	1,1±0,1a
21	-	-	1,27±0,02 <sup>a</sup>	2,3±0,1b
21	-	+	1,06±0,2 <sup>a</sup>	4,2±0,2c

**Tabla 4.3.** Efecto de un dador de NO, GSNO, en el contenido de proteínas solubles y en la actividad de fosfatasas ácidas de raíces de plantas en condición de escasez y suficiencia de P. Plantas de 8 días de edad desde el inicio de la germinación fueron sometidas durante 21 días a dos niveles de P (0 y 0,5 mM) y dos niveles de GSNO (0 y 0,1 mM). Los valores expresan el valor medio del contenido de proteínas solubles y la actividad de las enzimas fosfatasas  $\pm$  el error estándar. Los datos fueron analizados utilizando el ANOVA de dos vías y el Post Host test de Tukey. Las letras diferentes expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

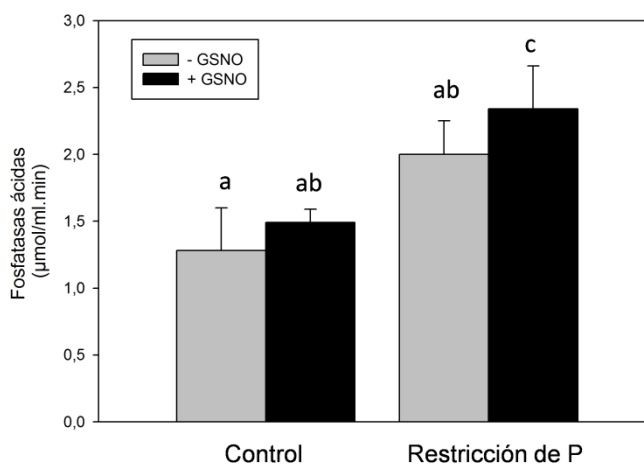
A fin de evaluar si los cambios observados sobre la actividad de las enzimas fosfatasa ácida, como consecuencia del tratamiento con GSNO, pueden deberse a un efecto directo del NO sobre las mismas (por ejemplo debido a algún tipo de modificación post-traducciona), llevamos adelante una serie de experimentos *in vitro* en los cuales se realizaron tratamientos de homogeneizados de raíces controles y deficientes en P, con GSNO, según se describe en materiales y métodos. Para ello se empleó una concentración de GSNO 10  $\mu$ M, y se realizaron incubaciones de hasta 45 min. Como puede observarse en la Figura 4.13, la exposición de las enzimas presentes en los homogeneizados al dador de NO *in vitro*, no generó modificaciones significativas en su actividad tanto para las raíces de plantas provenientes de condiciones de suficiencia ni de restricción de P.



**Figura 4.13.** Actividad de fosfatasa ácida luego de la exposición *in vitro* a un dador de NO (GSNO). Plantas de 8 días de edad desde el inicio de la germinación fueron sometidas durante 21 días a dos niveles de P (0 y 0,5 mM). Los homogeneizados de raíces controles (círculos) o restringidas en P (cuadrados) fueron incubados en oscuridad y en hielo hasta 45 minutos, en presencia (negros) o ausencia (blancos) de GSNO 10  $\mu$ M. La actividad de las enzimas fosfatasa ácida se midió periódicamente según se describe en materiales y métodos. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error del error estándar. Los datos fueron analizados utilizando el ANOVA de una vía y el Post Host test de Tukey.

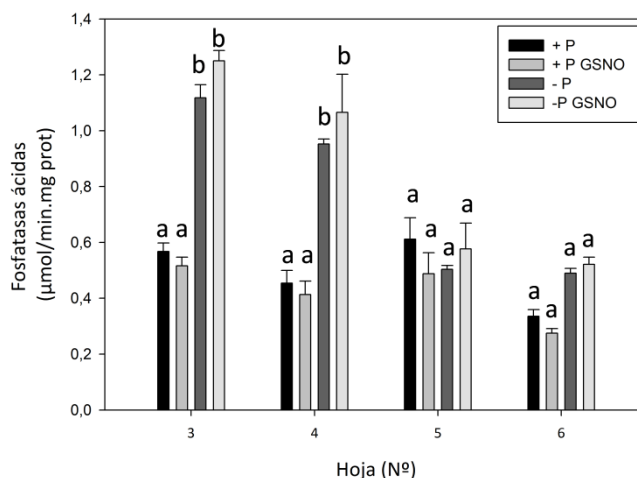
A fin de establecer si la actividad de las enzimas fosfatasa ácida observadas en la raíz (Figura 4.12) corresponde, al menos en parte, a enzimas que pueden ser excretadas al medio, tomamos alícuotas de la solución nutritiva de cada una de las macetas al final del experimento (21 días) y en las mismas cuantificamos la actividad enzimática. La cuantificación resulta compleja, ya que la actividad en la solución es muy baja, pero aun así, el déficit de P y el tratamiento con GSNO incrementan la actividad de las enzimas secretadas (Figura 4.14); presentando una aparente

correlación con los resultados obtenidos en homogeneizados de raíces controles y restringidas en P expuestas *in vivo* a GSNO (figura 4.12), y permitiendo especular con que, al menos en parte, la actividad enzimática evaluada en los tejidos correspondería a enzimas que son excretadas por las raíces frente a la deficiencia de P.



**Figura 4.14.** Efecto del dador de NO, GSNO, en la actividad de las enzimas fosfatasas acidas en la solución nutritiva de plantas en condiciones de suficiencia o deficiencia de P. Plantas de 8 días de edad desde el inicio de la germinación fueron sometidas durante 21 días a dos niveles de P (0 y 0,5 mM) y dos niveles de GSNO (0, y 0,1 mM). La actividad de las enzimas fosfatasas acidas se midió en alícuotas de solución nutritiva extraídas de las macetas en el momento de la cosecha final según se describe en materiales y métodos. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar. Los datos fueron analizados utilizando el test de ANOVA de dos vías y el Post hoc test de Tukey. Las letras diferentes expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

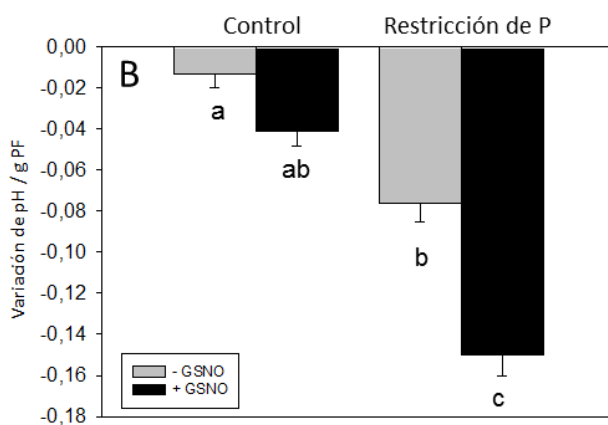
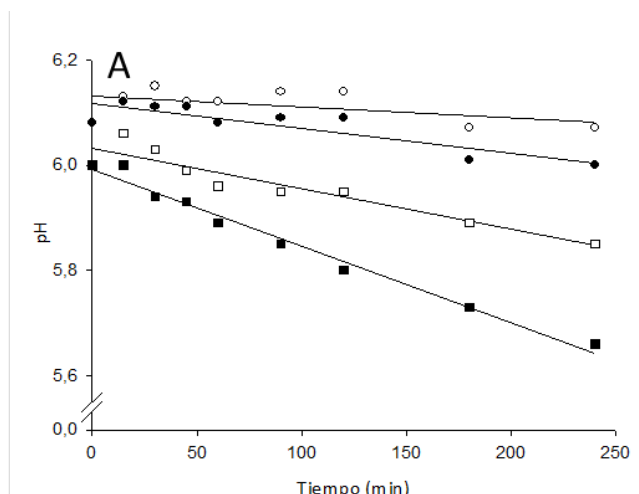
La actividad de las enzimas fosfatasas fue también cuantificada en las hojas de las plantas de maíz, excepto en las hojas 1 y 2 dado el avanzado estado de senescencia de las mismas. Se observó un efecto significativo del déficit de P sobre la actividad enzimática en las hojas más viejas evaluadas, hojas 3 y 4, (Figura 4.15) efecto que coincide con la senescencia (Figura 4.9 A y B) y la removilización del P hacia los tejidos más jóvenes, lo cual requiere la hidrólisis de las moléculas orgánicas de las cuales forma parte para poder ser transportado en forma de fosfato hacia los nuevos destinos. No se observaron diferencias atribuibles al efecto del NO en la actividad de las enzimas fosfatasas medida en hojas (Figura 4.15).



**Figura 4.15.** Actividad de las enzimas fosfatasa ácida en las hojas de plantas de maíz. Plantas de 8 días de edad desde el inicio de la germinación fueron sometidas durante 21 días a dos niveles de P (0 y 0,5 mM) y dos niveles de GSNO (0, y 0,1 mM). La actividad de las enzimas fosfatasa ácida se midió en los tejidos de las hojas según se describe en materiales y métodos. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar. Los datos fueron analizados utilizando el test de ANOVA de dos vías y el Post hoc test de Tukey. Las letras diferentes expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

Otra respuesta ampliamente evidenciada en plantas frente al déficit de P es la acidificación del medio rizosférico generado por el exudado de protones y ácidos orgánicos desde las raíces. En nuestras condiciones experimentales, llevamos adelante mediciones del cambio del pH a lo largo del tiempo en soluciones nutritivas no *bufferizadas*. Las plantas previamente cultivadas durante 6 días en los respectivos tratamientos de exposición a dos niveles de P y GSNO fueron transferidas a soluciones nutritivas bajo las mismas condiciones experimentales en las cuales crecían en ausencia de solución reguladora de pH MES. Pudimos observar claramente que las plantas provenientes de condiciones de suficiencia de P no generaron cambios importantes en el pH de la solución nutritiva, mientras que las plantas sometidas a condiciones de déficit generaron una clara disminución del pH (Figura 4.16 A). Al expresar el  $\Delta$ pH por gramo de peso fresco de raíz, se puede observar un efecto significativo del déficit de P sobre la acidificación de la solución. También se observa una mayor disminución del pH en las plantas expuestas a GSNO tanto en los tratamientos de suficiencia como de déficit de P, siendo en estos últimos significativa la diferencia observada (Figura 4.16 B).





**Figura 4.16.** Efecto de la exposición de plantas a un dador de NO (GSNO) en la acidificación de la solución nutritiva por las raíces. Plantas de 8 días de edad desde el inicio de la germinación fueron sometidas durante 6 días a dos niveles de P (0 y 0,5 mM) y dos niveles de GSNO (0 y 0,1 mM). **A.** muestra la evolución del pH en una maceta individual (sin MES) conteniendo plantas cultivadas previamente en presencia (círculos) o ausencia (cuadrados) de fosfato combinado con presencia (símbolos negros) o ausencia (símbolos blancos) de GSNO. **B.** Cambios en el pH de la solución nutritiva expresado en función de la unidad de masa de las raíces. El  $\Delta\text{pH}$  fue calculado como la diferencia entre el pH inicial y el pH después de 240 minutos de inmersión de la raíz en solución sin MES. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar. Los datos fueron analizados utilizando el test de ANOVA de dos vías y el Post hoc test de Tukey. Las letras diferentes expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

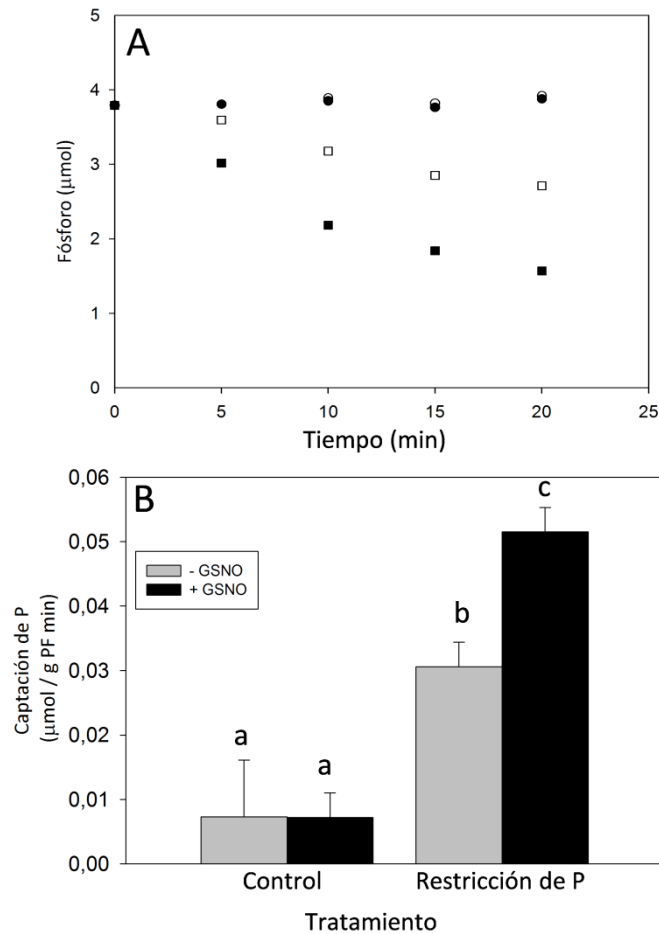
Para descartar la posible incidencia de otros compuestos generados a partir de la degradación del GSNO en el efecto observado sobre la acidificación del medio, se realizaron experimentos controles utilizando GSNO degradado ( $\text{GSNO}_d$ ) el cual fue adicionado en la solución nutritiva durante el crecimiento de las plantas de la misma forma que se habían realizado los tratamientos

con el GSNO. Las plantas controles que fueron expuestas a GSNO<sub>d</sub> durante 6 días presentaron un decaimiento del pH en relación al valor inicial similar al de las plantas controles ( $0,018 \pm 0.001$  unidades g<sup>-1</sup> PF a los 240 minutos), y las plantas expuestas a condiciones de déficit de P que simultáneamente fueron tratadas con GSNO<sub>d</sub> exhibieron un decaimiento del pH en relación al valor inicial de  $0.078 \pm 0.004$  unidades g<sup>-1</sup> PF en el mismo periodo. Por lo tanto no se evidenciaron diferencias significativas en la variación del pH debido a los tratamientos con GSNO<sub>d</sub> ni en las plantas controles, ni en las plantas expuestas a déficit de P.

Otro elemento clave en la capacidad de las plantas para adaptarse a ambientes con baja disponibilidad de P es la capacidad para captar el nutriente en soluciones de muy baja concentración del mismo. Para poder evidenciar si esta capacidad es modificada por el agregado exógeno de NO, se evaluó la depleción del contenido de P en una solución nutritiva (50 µM P) por parte de las raíces de plantas provenientes de tratamientos de suficiencia y déficit de P, en presencia o ausencia del dador de NO, GSNO. Pudimos observar que las plantas provenientes de soluciones carentes de P presentaron una mayor captación de P en la solución diluida, y que a su vez, las plantas provenientes de soluciones sin P expuestas al dador GSNO captaron más rápido el P que aquellas que no habían sido expuestas al dador (Figura 4.17 A).

Si expresamos la capacidad de captación de P de las raíces por gramo de peso fresco de las mismas correspondiente a los primeros 15 minutos del experimento (velocidad inicial), se observa una diferencia significativa entre las plantas provenientes de soluciones restringidas y de suficiencia de P, pero a su vez, dentro de las soluciones carentes de P, se observa un mayor incremento en la capacidad de las raíces de absorber P cuando estas plantas fueron previamente tratadas con el dador de NO, GSNO (Figura 4.17 B).

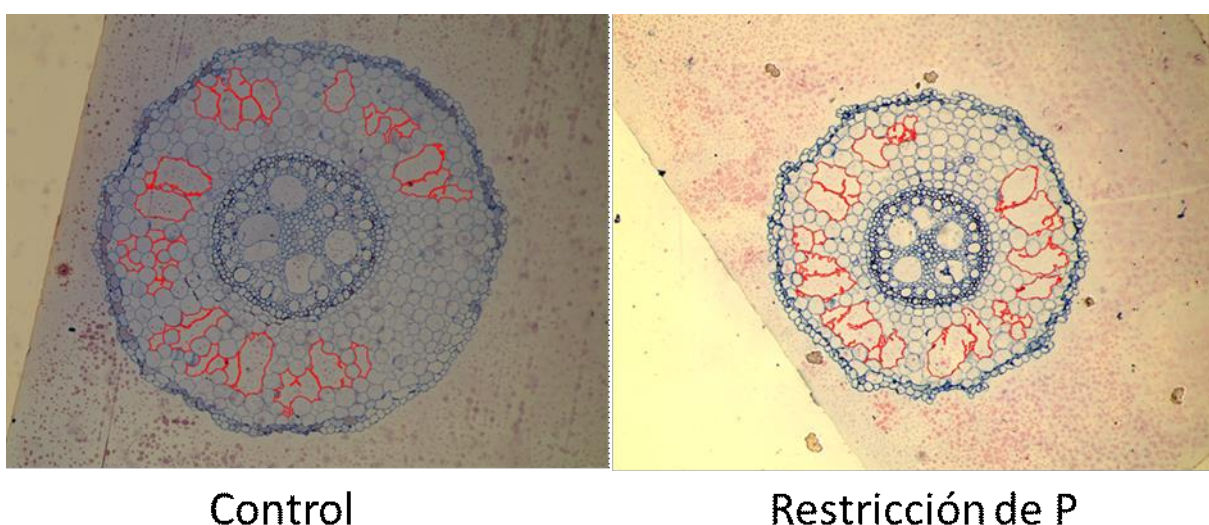
Para explorar la posible existencia de efectos secundarios generados por otros compuestos durante la degradación del GSNO, se realizaron experimentos empleando GSNO degradado (GSNO<sub>d</sub>), bajo el mismo esquema experimental que se había utilizado para los experimentos con GSNO preparado en el momento. No se observaron diferencias significativas en la capacidad de absorción de P por las raíces entre las plantas sometidas a tratamiento con GSNO<sub>d</sub> y aquellas provenientes de los tratamientos +P y -P ( $0,007 \pm 0,001$  µmol P g<sup>-1</sup> PF min<sup>-1</sup> para plantas controles tratadas con GSNO<sub>d</sub>, y  $0,021 \pm 0,006$  µmol P g<sup>-1</sup> PF min<sup>-1</sup> para plantas en condiciones de restricción de P tratadas con GSNO<sub>d</sub>).



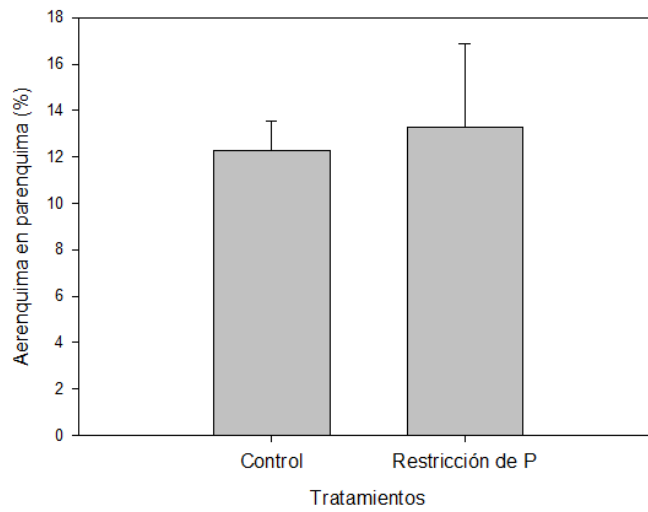
**Figura 4.17.** Efecto de un dador de NO y del estado nutricional previo en la adquisición de P a partir de soluciones diluidas. Plantas de 8 días de edad fueron cultivadas durante 6 días con dos niveles de P (0 y 0,5 mM), y dos niveles de GSNO (0 y 0,1mM). **A.** Disminución de la cantidad de P presente en una maceta conteniendo 50  $\mu$ M P en plantas previamente cultivadas en presencia (círculos) o ausencia (cuadrados) de P, combinado con la presencia (negro) o ausencia (blanco) de GSNO. **B.** Tasa de absorción de P de plantas previamente cultivadas en presencia o ausencia de P y GSNO, calculada como la diferencia de P entre la solución inicial y la solución luego de 15 minutos de inmersión de las raíces, expresado por gramo de peso fresco de raíz y por minuto. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar, los datos fueron analizados utilizando el ANOVA de dos vías y el Post hoc test de Tukey. Las letras diferentes expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

En trabajos previos se ha postulado al aumento de la eficiencia de la utilización de biomasa en la raíz como una estrategia desarrollada por la planta frente al déficit de P, lo que permitiría generar más superficie de contacto entre la raíz y el suelo, permitiendo explorar mayores volúmenes de suelo con menor producción de biomasa (Lynch y Ho, 2005; Mollier y Pellerin, 1999) . Una de las formas en que se puede incrementar la superficie explorada por unidad de biomasa resulta de la

generación de aerénquima en la zona parenquimática. Para analizar si existían variaciones en la presencia de aerénquima en la raíz como consecuencia la restricción de P, se llevaron adelante cortes transversales de raíces, las cuales previa tinción e inclusión en resina, se cortaron con micrótomomo y se fotografiaron al microscopio óptico. Las imágenes posteriormente fueron analizadas con el programa Image-J para cuantificar el área ocupada por el aerénquima en relación al área parenquimática total (Figura 4.18) y se calculó el porcentaje de aerénquima para cada réplica, no observándose diferencias significativas entre las plantas en condición de déficit y condiciones de suficiencia de P (Figura 4.19).



**Figura 4.18.** Determinación del área parenquimática ocupada por aerénquima en cortes transversales de raíz a 1 cm del ápice. Los cortes fueron fijados en FAA, incluidos en resina y cortados en micrótomomo con un espesor de 5  $\mu\text{m}$ . Las fotografías fueron tomadas en el microscopio óptico y las imágenes analizadas con el programa Image-J, integrando las áreas de aerénquima y parénquima.



**Figura 4.19.** Efecto del déficit de P sobre la generación de aerénquima en raíz. Plantas de 8 días de edad fueron cultivadas durante 6 días en presencia (control) de 0,5 mM o ausencia (restricción) de fosfato, n=5. Las barras expresan el porcentaje del área total de parénquima ocupada por aerénquima y las líneas de error indican el error estándar de las mediciones. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar, los datos fueron analizados utilizando test t de Student ( $p < 0,05$ ) y el Post hoc test de Tukey.

## Deficiencia de P en plantas de soja: Efectos tempranos sobre el proteoma y el metabolismo de óxido nítrico



## 4.2 Deficiencia de P en plantas de soja: Efectos tempranos sobre el proteoma y el metabolismo de óxido nítrico

### 4.2.1 Crecimiento y parámetros fotosintéticos durante la restricción de P

Diez días después de la siembra, las plántulas de soja creciendo en solución de Hoagland completa, según se describió en materiales y métodos, fueron expuestas a restricción de P. El diseño experimental (Figura 3.2) implicó la aplicación de los tratamientos de restricción en momentos diferentes (15, 24 y 48 h antes de la cosecha) para de esta manera poder cosechar plantas de la misma edad expuestas a diferentes tiempos de restricción de P.

No se observaron cambios en la pigmentación, tamaño o número de hojas entre las plantas provenientes de los diferentes grupos. En este sentido, ni el peso fresco ni la relación vástago/raíz, (expresada en peso fresco), mostraron diferencias entre los tratamientos de restricción de P de hasta 48 h (Tabla 4.4).

Tiempo de tratamiento (h)	Raíz PF (g)	Vástago PF (g)	Vástago/Raíz (PF)
0	1,2 ± 0,1a	2,4 ± 0,2a	2,1 ± 0,1 <sup>a</sup>
15	1,0 ± 0,1a	2,2 ± 0,2a	2,3 ± 0,2 <sup>a</sup>
24	1,20 ± 0,08a	2,7 ± 0,1a	2,30 ± 0,07 <sup>a</sup>
48	1,3 ± 0,1a	2,7 ± 0,2a	2,2 ± 0,2 <sup>a</sup>

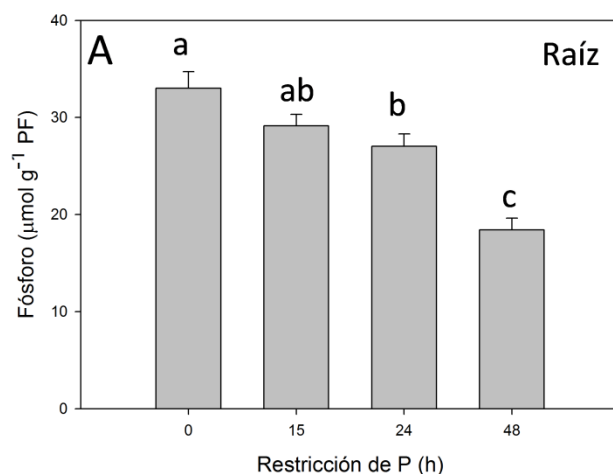
**Tabla 4.4.** Peso fresco de raíz y vástago y relación vástago/raíz en plantas de soja con hasta 48 h de restricción nutricional. Los valores corresponden a la media ± SE de siete experimentos independientes con n=3. La información fue analizada mediante ANOVA de una vía y post hoc test de Tukey (p < 0,05).

El efecto de la restricción de P sobre la fotosíntesis fue evaluado en el primer par de hojas unifoliadas totalmente expandidas. Se midió la concentración de clorofila y el rendimiento cuántico del fotosistema II ( $\Phi$  PSII) los cuales no exhibieron cambios significativos hasta las 48 h de restricción (Tabla 4.5).

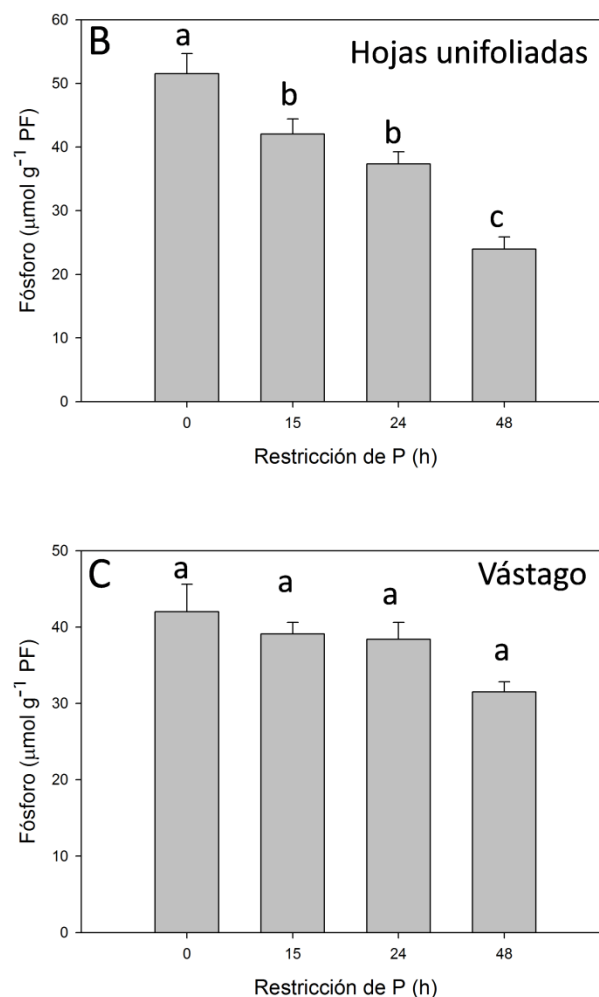
Tiempo de Tratamiento (h)	Clorofila a ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	Clorofila b ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	Clorofila total ( $\mu\text{g cm}^{-2}$ )	$\Phi$ PSII
0	25,0 $\pm$ 1a	6,5 $\pm$ 0,3a	32 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	0,707 $\pm$ 0,007 <sup>a</sup>
15	26,1 $\pm$ 1a	6,7 $\pm$ 0,3a	33 $\pm$ 1 <sup>a</sup>	0,701 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
24	25,8 $\pm$ 0,6a	6,7 $\pm$ 0,1a	32,4 $\pm$ 0.7a	0,731 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
48	25 $\pm$ 1a	6,5 $\pm$ 0,3a	31 $\pm$ 1a	0,721 $\pm$ 0,02a

**Tabla 4.5.**Concentración de clorofila y  $\Phi$  PSII en la primera hoja unifoliada de plantas de soja expuestas restricción de P. Los datos corresponden a la media de dos experimentos independientes, n=4. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar, los datos fueron analizados utilizando ANOVA de una vía y el Post hoc test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Como consecuencia de los tratamientos, la concentración de P decreció en función del tiempo en aquellas plantas sometidas a restricción de P. Las raíces exhibieron una caída significativa en la concentración total de P luego de 24 h de tratamiento (Figura 4.20 A), y en el primer par de hojas unifoliadas se observó una caída significativa en la concentración de P a partir de las 15 h de tratamiento (Figura 4.20 B). Sin embargo en los vástagos, la concentración de P permaneció sin cambios significativos para todos los tiempos evaluados (Figura 4.20 C).



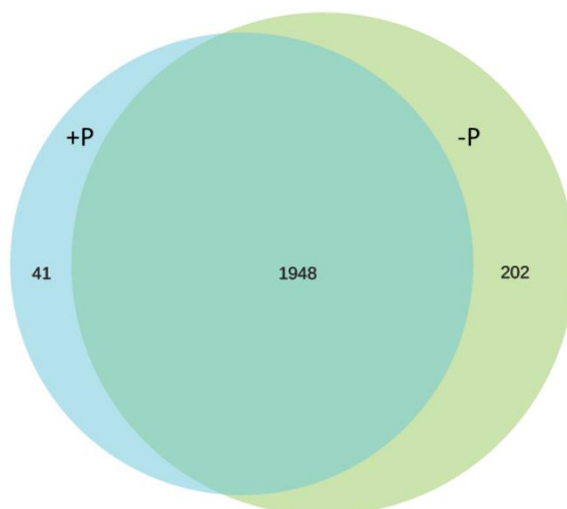




**Figura 4.20.** Efecto de la privación de P en el medio de cultivo sobre la concentración de P en los tejidos. Plantas de 10 días desde el inicio de la germinación creciendo en solución Hoagland completa (0,5 mM P) fueron transferidas a macetas conteniendo solución nutritiva en presencia (0,5 mM) o ausencia (0 mM) de P. **A.** Concentración de P (expresada en función del fresco, PF) en las raíces, **B.** Concentración de P (expresada en función del fresco, PF) en las hojas, **C.** Concentración de P (expresada en función del fresco, PF) en los vástagos. Los valores expresan la media  $\pm$  ES (error estándar). Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar, los datos fueron analizados utilizando el ANOVA de una vía y el Post hoc test de Tukey. Las letras diferentes expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.2 Análisis de proteómica

Debido a que ya a las 24 h se evidenció una disminución del P en las hojas unifoliadas, se utilizó una técnica de *Shotgun* para evaluar cambios tempranos en el proteoma en este tiempo. Un total de 2191 proteínas fueron identificadas en los tejidos de la hoja en plantas tratadas con restricción y suficiencia de P.



**Figura 4.21.** Diagrama de Venn correspondiente a las proteínas identificadas en hojas unifoliadas de soja en las condiciones de suficiencia y restricción de P (24 h). Las proteínas presentes en al menos 2 de los 3 replicados biológicos de uno de los tratamientos y ausentes todos los replicados del otro tratamiento fueron consideradas como únicas.

Luego de 24 h de restricción de P, 202 proteínas fueron exclusivamente expresadas en las hojas sometidas a restricción de P (Figura 4.21, Tabla 4.6, Tabla suplementaria 1: <https://owncloud.agro.unlp.edu.ar/owncloud/index.php/s/XIG3WeBvKPPWvwp>). Estas proteínas que no fueron detectadas en las muestras control, se clasificaron por su función molecular de acuerdo al consorcio *Gene Ontology* en seis clases funcionales (Figura 4.22): *translation regulator activity*, *binding*, *structural molecule activity*, *catalytic activity*, *antioxidant activity*, and *transporter activity*. La actividad catalítica resultó el grupo más grande, incluyendo 77 proteínas (43 %) entre las que se encuentran: glucosa-6-fosfato 1-dehidrogenasa (vía de las pentosas fosfato), glicosiltransferasas (subfamilia: UDP-glicosiltransferasa), fructosa-pirofosfato 6-fosfato 1-fosfotransferasa subunidad alfa (asociada al metabolismo de los carbohidratos), proteínas de la familia chalcona-flavonona isomerasa, y chalcona y estilbeno sintasas (metabolismo de flavonoides), y otras proteínas correspondientes a procesos biosintéticos; como metiltioribulosa-1-fosfato deshidratasa (metabolismo de la metionina), 3-dehidroquinato sintasa (vía del ácido shikímico); y metabólicos como aspartato amino transferasa, cisteín proteinasas, y otras peptidasas. Es interesante mencionar la presencia de una isoforma de la enzima nitrato reductasa (Glyma.13G084000) involucrada en el metabolismo del nitrógeno y del NO, y la presencia de una fosfatasa ácida (*purple acid phosphatase*) relacionada a la adquisición y remobilización de P en las plantas (Chamizo-Ampudia y col., 2017; Gao y col., 2017).

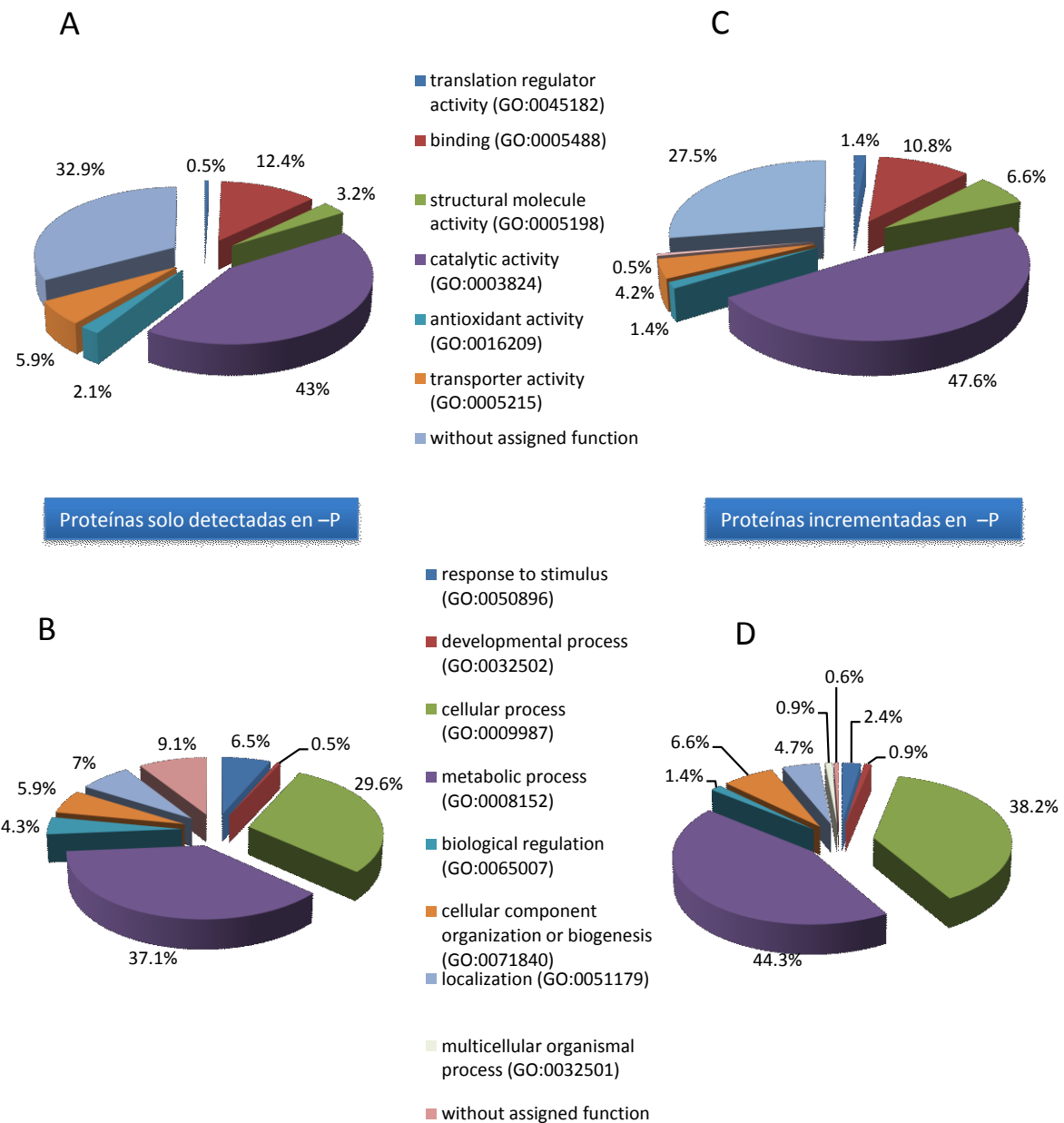
Uniprot ID	Replicados	Señal total	Descripción
A0A0R0EK65	3	17	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M (Glycine max)</i>
A0A0R0GXD9	2	3	<i>Peroxidase (Glycine max)</i>
A0A0R0HLZ4	3	11	<i>Uncharacterized protein (Glycine max), 83,7 % identity with 3-dehydroquinase synthase from Arabidopsis thaliana</i>
A0A0R4J387	2	3	<i>Chalcone-flavonone isomerase family protein (Glycine max)</i>
A0A0R4J5E9	2	3	<i>Peroxidase (Glycine max)</i>
C6TB14	3	22	<i>Uncharacterized protein (Glycine max), 90,1 % identity Ribosomal protein L35Ae family protein from Arabidopsis thaliana</i>
C6THM2	3	10	<i>Annexin (Glycine max)</i>
I1JCF7	3	10	<i>Alpha-mannosidase (Glycine max)</i>
I1JEV7	3	15	<i>Uncharacterized protein (Glycine max), 93.7 % Putative carboxylesterase 2 (Glycine soja)</i>
I1JI26	2	6	<i>Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase (Glycine max)</i>
I1JMB0	3	11	<i>Uncharacterized protein (Glycine max), 97.5 % identity Protein transport protein SEC23 (Glycine soja)</i>
I1JN84	3	15	<i>Uncharacterized protein (Glycine max), 78.9 % identity SQD1 sulfoquinovosyldiacylglycerol (Arabidopsis thaliana)</i>
I1JNA7	2	12	<i>Calcium-transporting ATPase (Glycine max)</i>
I1JR33	2	6	<i>Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (Glycine max)</i>
I1JRU2	2	11	<i>Uncharacterized protein (Glycine max), 78.8 % identity ILA ILITYHIA (Arabidopsis thaliana)</i>
I1JSY1	3	13	<i>Uncharacterized protein (Glycine max), 76.3 % identity Prolyl oligopeptidase family protein (Arabidopsis thaliana)</i>
I1K0G0	2	15	<i>Uncharacterized protein (Glycine max), 84.4 % identity Hsc70-interacting protein (Medicago truncatula)</i>
I1K4M0	3	29	<i>Uncharacterized protein (Glycine max), 81.8 % identity Aspartate aminotransferase (Medicago truncatula)</i>
I1K5D3	2	14	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C (Glycine max)</i>
I1KAF8	2	14	<i>Uncharacterized protein (Glycine max), 54.6 % identity Chalcone and stilbene synthase family protein (Arabidopsis thaliana)</i>
I1KB94	3	11	<i>Alpha-galactosidase (Glycine max)</i>
I1KGJ0	2	9	<i>Uncharacterized protein (Glycine max), 74.5 % identity PEN3, PDR8, ATPDR8, ABCG36, ATABCG36 ABC-2 and Plant PDR ABC-type transporter family protein (Arabidopsis thaliana)</i>
I1KKN7	3	15	<i>Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha (Glycine max)</i>
I1KN68	3	10	<i>Glycosyltransferase (Glycine max)</i>
I1KQ16	3	15	<i>Uncharacterized protein (Glycine max), 66.3 % identity PLSP1 plastidic type i signal peptidase 1 (Arabidopsis thaliana)</i>
I1KSB8	3	12	<i>Uncharacterized protein (Glycine max), 84.9 % identity Ribosomal protein L32e (Arabidopsis thaliana)</i>
I1KT58	3	28	<i>Uncharacterized protein (Glycine max), 82,8 % identity ATAAT, AAT, MEE17 aspartate aminotransferase (Arabidopsis thaliana)</i>
I1KY24	3	23	<i>Uncharacterized protein (Glycine max), 66.4% identity RHM1,</i>

I1L1Q4	2	14	ROL1, ATRHM1 rhamnose biosynthesis (Arabidopsis thaliana) Uncharacterized protein (Glycine max), 72 % identity Cysteine proteinases superfamily protein (Arabidopsis thaliana)
I1L9R9	3	11	Uncharacterized protein (Glycine max), 65.4 % identity ATAB2 RNA binding (Arabidopsis thaliana)
I1LDY8	3	16	Uncharacterized protein (Glycine max), 79.3 % identity APS1 ATP sulfurylase (Arabidopsis thaliana)
I1LF33	2	7	Mitochondrial pyruvate carrier (Glycine max)
I1LKU8	2	16	Uncharacterized protein (Glycine max), 82 % identity cytochrome-c oxidases; electron carriers (Arabidopsis thaliana)
I1LLG1	2	11	Uncharacterized protein (Glycine max), 62.4% identity TRX P, TRX z Thioredoxin z (Arabidopsis thaliana)
I1LV18	3	9	Probable bifunctional methylthioribulose-1-phosphate dehydratase/enolase-phosphatase E1 (Glycine max)
I1LW34	2	14	Nitrate reductase (Glycine max)
I1LWT5	3	12	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit M (Glycine max)
I1LY18	3	17	Uncharacterized protein (Glycine max), 71.9 % identity Lactoylglutathione lyase/glyoxalase I family protein (Arabidopsis thaliana)
I1MON9	3	12	Uncharacterized protein (Glycine max), 98.5 % identity NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 6 (Glycine soja)
I1M368	2	7	Probable bifunctional methylthioribulose-1-phosphate dehydratase/enolase-phosphatase E1 (Glycine max)
I1MKN2	3	13	Uncharacterized protein (Glycine max), 81 % identity GHBDH, ATGHBDH, GLYR1, GR1 glyoxylate reductase 1(Arabidopsis thaliana)
I1MN72	3	31	Uncharacterized protein (Glycine max), 93.4% identity Ribosomal protein L2 family (Arabidopsis thaliana)
I1MPF4	2	5	Glycosyltransferase (Glycine max)
I1MSB3	3	14	Uncharacterized protein (Glycine max), 97.7% identity 12-oxophytodienoate reductase 3 (Glycine soja)
I1MU40	2	7	Uncharacterized protein (Glycine max), 77.3 % identity ATSPS1F, SPS1F sucrose phosphate synthase (Arabidopsis thaliana)
I1MWJ7	2	13	Uncharacterized protein (Glycine max), 79.1% identity Protein kinase superfamily protein (Arabidopsis thaliana)
I1N2U9	2	11	Uncharacterized protein (Glycine max), 78.8 % identity ATPAT6, GPAT6 glycerol-3-phosphate acyltransferase (Arabidopsis thaliana)
I1N362	2	6	Peroxidase (Glycine max)
I1N3W7	2	16	Uncharacterized protein (Glycine max), 79.3 % identity CYP97A3, LUT5 cytochrome P450, family 97, subfamily A, polypeptide 3 (Arabidopsis thaliana)
I1NBC5	3	20	Uncharacterized protein (Glycine max), 89.4 % identity Calvin cycle protein CP12 (Glycine soja)
I1ND14	3	21	Pyrophosphate-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha (Glycine max)
I1NGW3	2	12	Uncharacterized protein (Glycine max), 71.5 % identity NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein (Arabidopsis thaliana)
I1NHC6	2	16	Uncharacterized protein (Glycine max), 83.1 % identity CINV2

K7KQ60	2	25	cytosolic invertase 2( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) Uncharacterized protein ( <i>Glycine max</i> ), 78.4 % identity Aldolase-type TIM barrel family protein ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )
K7KVS7	3	11	Pantothenate kinase 2 ( <i>Glycine max</i> )
K7LBW0	3	14	60S ribosomal protein L27 ( <i>Glycine max</i> )
K7LE67	3	4	Eukaryotic translation initiation factor 6 ( <i>Glycine max</i> )
K7LHW2	3	16	Uncharacterized protein ( <i>Glycine max</i> ), 91.2 % identity PDF1, PR 65, PP2AA2 protein phosphatase 2A subunit A2 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )
K7MNZ5	3	17	Uncharacterized protein ( <i>Glycine max</i> ), 78.6% identity Papain family cysteine protease ( <i>Medicago truncatula</i> )
K7MR48	2	27	Uncharacterized protein ( <i>Glycine max</i> ), 44.9 % identity NB-ARC domain disease resistance protein ( <i>Medicago truncatula</i> )
M1FPG4	3	10	NADH dehydrogenase subunit 2 ( <i>Glycine max</i> )
P62163	3	19	Calmodulin-2( <i>Glycine max</i> )
Q09131	2	3	Purple acid phosphatase ( <i>Glycine max</i> )
Q2PMP9	3	39	50S ribosomal protein L14, chloroplastic ( <i>Glycine max</i> )

**Tabla 4.6.** Principales proteínas encontradas exclusivamente en hojas –P que presentan un elevado score y relevancia biológica.

Dentro de las proteínas relacionadas a la actividad de transporte (*transporter activity*), es importante mencionar aquellas que acoplan la actividad ATPasa al movimiento de sustancias, como el Ca (*calcium-transporting ATPase*), proteínas con actividad transportadora pertenecientes a la familia *ABC transporters*, relacionadas con procesos de detoxificación, nutrición, desarrollo, respuesta a estrés abiótico, resistencia a patógenos e interacción con el ambiente (Kang y col., 2011). Otras proteínas con actividad transportadora identificadas fueron el transportador de piruvato mitocondrial, y proteínas con actividad de transporte de iones y carbohidratos.



**Figura 4.22.** Clasificación de las proteínas según Gene Ontology. **A.** Clasificación según función molecular de proteínas sólo detectadas en plantas luego de 24 h de restricción de P; **B.** Clasificación según procesos biológicos de proteínas sólo detectadas en plantas luego de 24 h de restricción de P; **C.** Clasificación según función molecular de proteínas incrementadas luego de 24 h de restricción de P; **D.** Clasificación según procesos biológicos de proteínas incrementadas luego de 24 h de restricción de P. Todas las proteínas provienen de las hojas unifoliadas de plantas creciendo en presencia de 0 y 0,5mM de P en el medio de cultivo durante 24 h.

Entre las proteínas con participación en la regulación de la transcripción se pueden destacar componentes del complejo *eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3)* requerido en varios

pasos en la iniciación de la síntesis de proteínas (*eukaryotic translation initiation factor 3 subunits C and M*). Las principales proteínas con funciones estructurales son constituyentes de subunidades de los ribosomas. El grupo de proteínas de unión (*binding*), hace referencia a proteínas que interactúan selectivamente, pero no de forma covalente con otras proteínas o complejos proteicos,  $\text{Ca}^{2+}$ , RNA y lípidos. En este grupo heterogéneo de proteínas donde hay proteínas que participan de diversos procesos celulares, se incluye la *calmodulin-2*, proteína capaz de mediar el control de un gran número de enzimas, canales iónicos y otras proteínas mediante su unión con el  $\text{Ca}^{2+}$ . Entre las enzimas moduladas por el complejo calmodulin- $\text{Ca}^{2+}$  hay quinasas y fosfatasas. Finalmente el grupo de proteínas con actividad antioxidante incluye proteínas con actividad peroxidasa.

Entre las proteínas sin función asignada en esta clasificación (*Phanter Go Slim molecular function*) podemos mencionar proteínas como alfa manosidasas, proteínas relacionadas a la síntesis de sulfolípidos (*UDP-sulfoquinovose synthase activity*), síntesis del ácido jasmónico (*oxophytodienoate-reductase*), transportadores y proteínas con actividad proteasa. En la Figura 4.22, también se muestra la clasificación por procesos biológicos (panel B y D), donde el grupo principal incluye proteínas involucradas en procesos metabólicos.

En relación a las proteínas detectadas en ambas condiciones (+P y -P) (Figura 4.23), 232 mostraron una abundancia relativa incrementada en las hojas -P. El perfil obtenido en la clasificación según la función molecular resultó muy similar al perfil obtenido para las proteínas exclusivamente detectadas en las plantas con restricción de P (Figura 4.22 C) con siete clasificaciones funcionales, siendo el grupo de actividad catalítica el de mayor porcentaje de proteínas. Dentro de las proteínas con actividad catalítica podemos mencionar algunas proteínas que podrían explicar los cambios metabólicos durante las primeras horas de restricción de P: como la cisteína sintasa; S-adenosilmetionina sintasa, importante en la síntesis del precursor de etileno S-adenosilmetionina (SAM); alfa-1,4 glucano fosforilasas, enzimas del metabolismo de los carbohidratos ampliamente conocidas por la degradación del almidón; enzimas involucradas en procesos metabólicos como gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa, piruvato quinasa, fructuosa-bifosfato aldolasa (glucólisis); malato deshidrogenasa, aconitato hidratasa (vía de los ácidos tricarboxílicos); 6-fosfogluconato deshidrogenasa (vía de las pentosas fosfato); glicolato oxidasa (fotorrespiración); ácido delta-aminolevulínico deshidratasa (síntesis de grupos hemo y clorofila). Adicionalmente, otras enzimas involucradas en el metabolismo y procesos catalíticos de aminoácidos se vieron incrementadas en





proteínas diferencialmente abundantes entre condiciones. Algunas de las proteínas discutidas en el texto son indicadas y otros detalles se pueden encontrar en la tabla suplementaria 1.

Sólo 41 proteínas fueron detectadas exclusivamente en las hojas de plantas control (Figura 4.21, tabla suplementaria 1). En relación a las proteínas disminuidas en hojas bajo condiciones de restricción de P (se expresan como aumentadas de manera en condiciones de adecuado suministro de P de forma relativa a lo observado en condiciones de restricción nutricional), se evidencia una gran participación de proteínas involucradas en la fotosíntesis (Tabla 4.7; figura 4.23), como complejos clorofila-proteína, y proteínas que participan en la fosforilación oxidativa y el ciclo de Calvin, como la RuBisCO. Otras proteínas disminuidas en condiciones de restricción incluyen a la lipoxigenasa 1, fosfolipasa D alfa 1, y proteínas involucradas en la síntesis de metionina (Figura 4.23; Tabla suplementaria 1).

Uniprot ID	Fold change	pValue	Descripción
A0A0R0I8Z5	1,39	0,022	<i>Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic</i>
A0A0R4J5I3	1,52	0,028	<i>Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic</i>
C6T1C8	1,51	0,00025	<i>Uncharacterized protein in soybean, 88 % identity with PSAL photosystem I subunit I, AT4G12800.1</i>
C6T868	1,42	0,0039	<i>Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic</i>
C6TD73	1,55	0,0083	<i>Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic</i>
C6TLM4	1,53	0,037	<i>Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic</i>
I1J593	1,87	0,003	<i>Carbonic anhydrase</i>
I1J7A8	1,33	0,017	<i>Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic</i>
I1JC28	1,84	0,0029	<i>Carbonic anhydrase</i>
I1JLH0	1,31	0,0089	<i>Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic</i>
I1K1G3	1,61	6,23E-05	<i>Carbonic anhydrase</i>
I1KHL4	1,96	0,031	<i>Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic</i>
I1KJK6	1,47	0,036	<i>Plasma membrane ATPase</i>
I1LMQ5	1,77	0,012	<i>Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic</i>
I1MZ32	1,45	0,0088	<i>Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic</i>
I1N5Q2	1,62	0,0001	<i>Carbonic anhydrase</i>
K7K479	1,67	0,018	<i>Uncharacterized protein in Glycine max, 92.8% identity with ATLFNR1, FNR1 ferredoxin-NADP(+)-oxidoreductase 1, AT5G66190.1</i>
K7LQ77	3,52	0,0034	<i>Uncharacterized protein in Glycine max, 90,1% identity with PSBB photosystem II reaction center protein B</i>

K7LWI4	1,87	0,0025	<i>ATP synthase subunit alpha</i>
K7M9Q3	1,80	0,029	<i>Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic</i>
P09756	1,46	0,024	<i>Chlorophyll a-b binding protein 3, chloroplastic</i>
P27066	2,74	0,0063	<i>Ribulose biphosphate carboxylase large chain</i>
Q2PMQ5	2,12	0,04	<i>Cytochrome b6</i>
Q2PMQ9	2,42	0,00012	<i>Photosystem II CP47 reaction center protein</i>
Q2PMS8	1,36	0,0074	<i>ATP synthase subunit alpha, chloroplastic</i>
Q2PMT8	1,57	0,035	<i>Photosystem II D2 protein</i>
Q2PMU2	1,79	0,0028	<i>Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2</i>
Q2PMU3	1,99	0,037	<i>Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A1</i>
Q71EW8	1,59	0,01	<i>Methionine synthase</i>

**Tabla 4.7:** Lista de algunas proteínas incrementadas en el proteoma de las hojas de plantas control (+P) en comparación a plantas privadas de P.

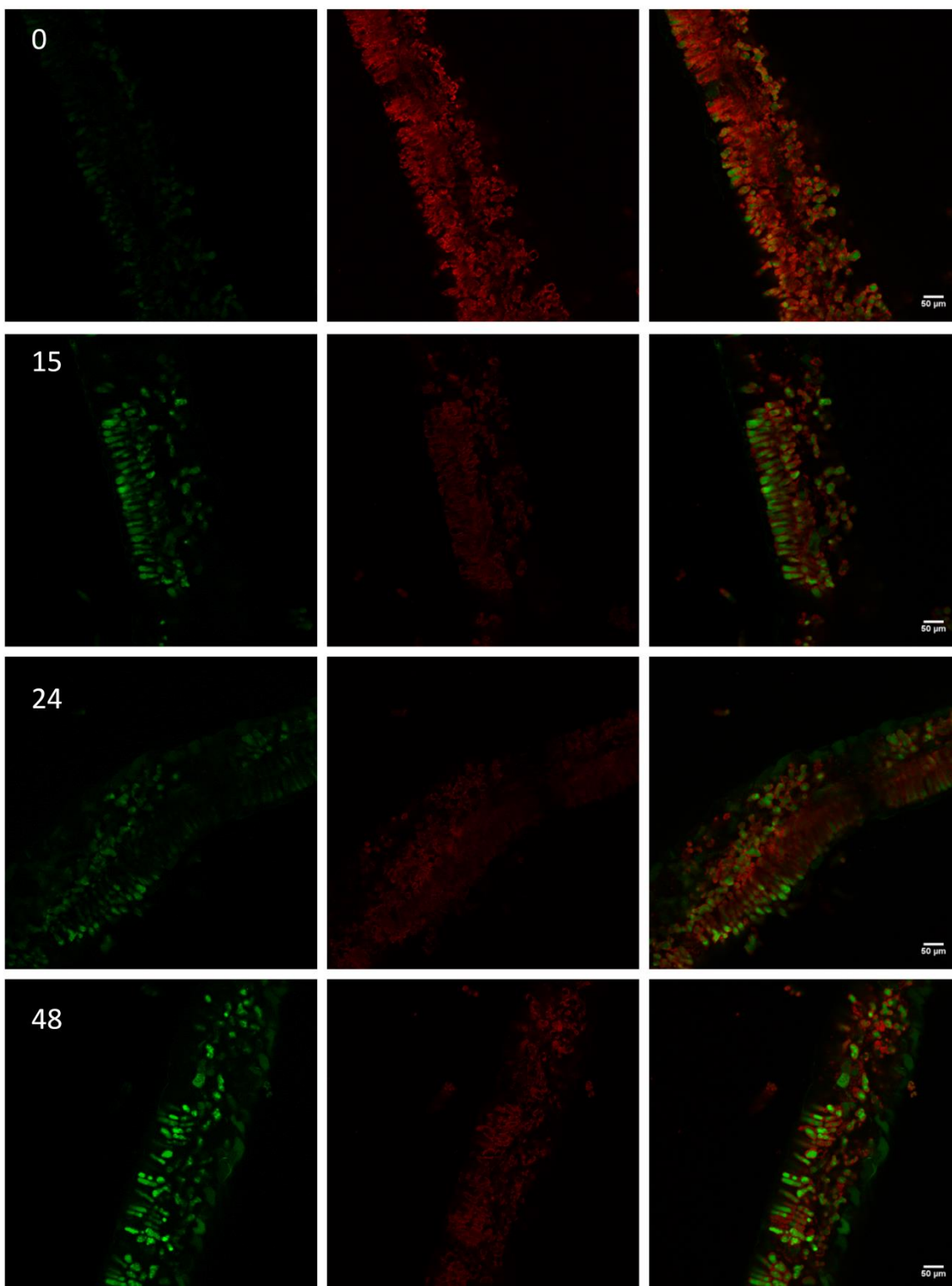
#### 4.2.3 Detección de niveles de NO y ROS en hojas bajo restricción de P

Examinamos cómo la restricción de P en la solución nutritiva afectó los niveles de NO y ROS en las hojas. El primer par de hojas de plantas provenientes de tratamientos de suficiencia y restricción de P fue separado de la planta, las hojas cortadas en tiras delgadas, e incubadas con DAF-FM DA, una sonda permeable a las membranas que reacciona con un producto de la oxidación del NO ( $N_2O_3$ ) (Kojima y col., 1998). Se llevaron adelante análisis de la fluorescencia empleando microscopia confocal. Una mayor intensidad de la señal verde sugirió un incremento en el nivel de NO en las hojas como consecuencia de la privación de P (Figura 4.24) a partir de las 15 h y más marcadamente a partir de las 24 h. En los tejidos incubados sin DAF-FM DA no se observó fluorescencia, descartando la posibilidad de autofluorescencia.

DAF-FM  
fluorescencia

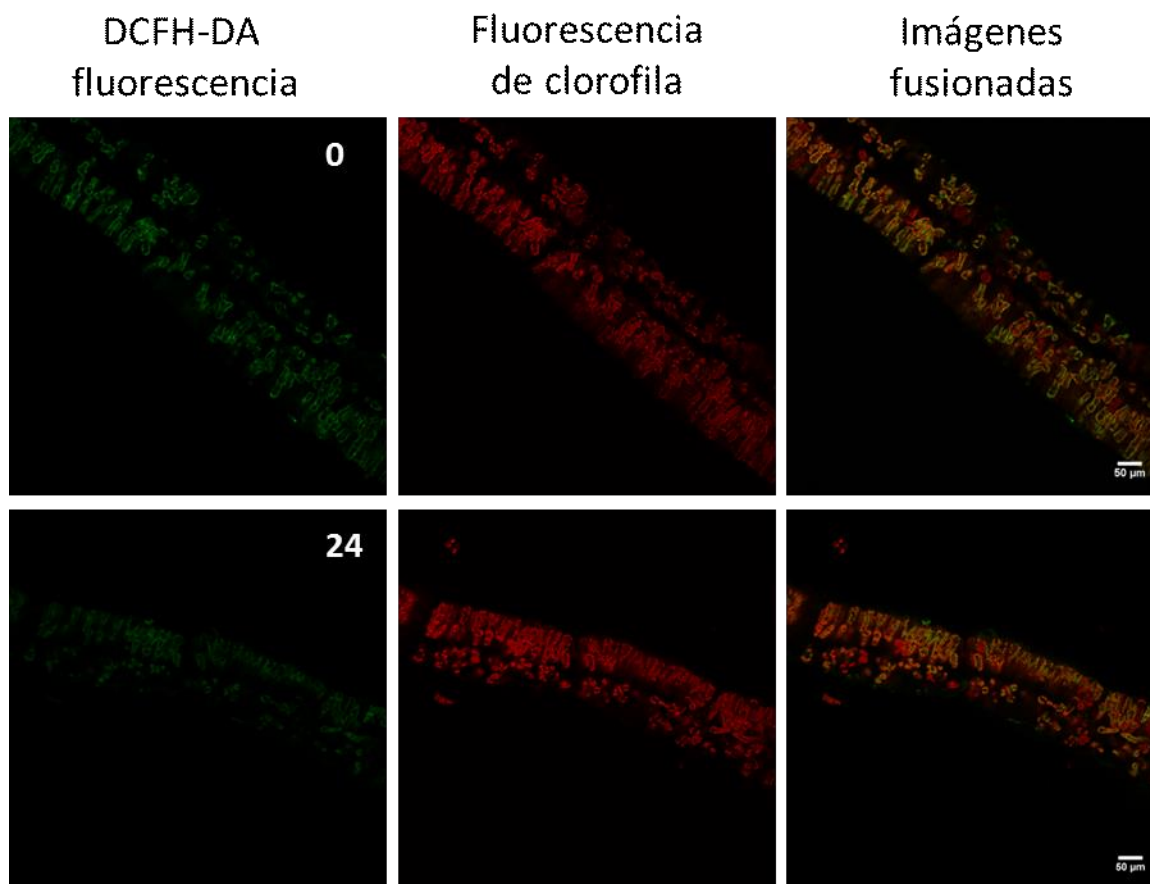
Fluorescencia de  
clorofila

Imágenes  
fusionadas



**Figura 4.24.** Detección de NO en hojas de soja. Hojas provenientes de plantas controles y tratadas con diferentes tiempos de restricción de P fueron incubadas en DAF-FM DA 17  $\mu$ M por 30 minutos y observadas en microscopio confocal laser ( $\lambda$  excitación = 488 nm y  $\lambda$  emisión = 500-525 nm). En la imagen se observa la presencia de NO en color verde y la autofluorescencia de clorofila en rojo ( $\lambda$  excitación = 488 nm y  $\lambda$  emisión = 670-730 nm), las imágenes son representativas de dos experimentos independientes (n=3).

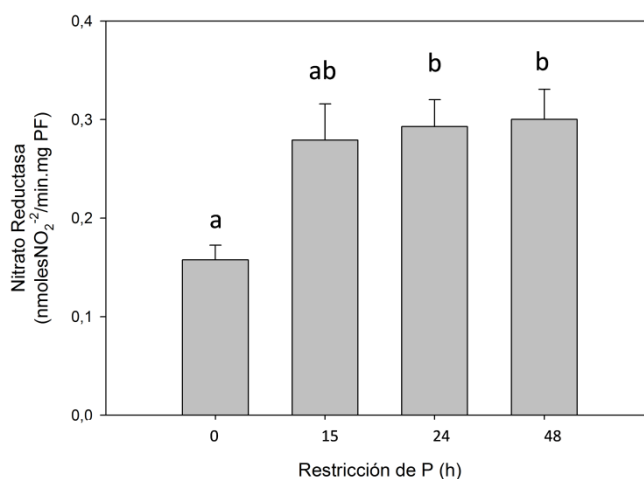
Para estimar los niveles de ROS, cortes delgados de hojas fueron incubados en presencia de DCFH-DA (Tyburski y col., 2009). La sonda DCFH-DA puede atravesar la membrana plasmática y luego de ser desacetilada por las esterasas intracelulares es oxidada por reacción con las ROS al compuesto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Las observaciones en el microscopio confocal muestran puntos de fluorescencia verdes en las células (Figura 4.25). La co-localización de la DCFH-DA y la fluorescencia de clorofila se observa en color amarillo-anaranjado, indicando la presencia de ROS principalmente en los cloroplastos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las hojas de plantas en condiciones de restricción de P en relación a las plantas controles hasta las 48 h (se muestra solo hasta 24 h) de tratamiento de restricción de P.



**Figura 4.25.** Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) en hojas de soja empleando una sonda fluorescente y microscopia confocal laser. Secciones delgadas de hojas provenientes de plantas control y de plantas sometidas a restricción de P fueron incubadas en presencia de DCFH-DA 50  $\mu$ M por 30 minutos, luego fueron lavadas por 10 minutos y observadas. Se muestran las fotos correspondientes a las hojas controles y luego de 24 h de restricción de P. En la imagen se observa la presencia de ROS en color verde ( $\lambda$  excitación = 488 nm y  $\lambda$  emisión = 500-525 nm), la autofluorescencia de clorofila en rojo ( $\lambda$  excitación = 488 nm y  $\lambda$  emisión = 670-730 nm), y las imágenes fusionadas mostrando la co-localización de la clorofila y las ROS en naranja. Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes (n=3).

#### 4.2.4. Actividad Nitrato Reductasa (NR) *in vivo*

Como la señal proveniente del NO parece distribuirse principalmente del citoplasma celular, y la NR citosólica ha sido propuesta como una de las fuentes de generación de NO en plantas, a continuación medimos la actividad NR *in vivo*. Observamos que la actividad NR se incrementó en las plantas restringidas en P (Figura 4.26) de manera similar a lo observado en la detección de NO por microscopía confocal (Figura 4.24).



**Figura 4.26.** Actividad NR *in vivo* en hojas unifoliadas de soja provenientes de plantas testigo o sometidas a distintos periodos de restricción de P. Los datos fueron analizados por análisis de la varianza (ANOVA) y test de Tukey. Las letras indican significancia de las diferencias ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.5 Detección de proteínas nitradas

Las proteínas nitradas fueron identificadas empleando cromatografía líquida con espectrometría de masas *Shotgun* (LC-MS/MS). Las hojas provenientes de plantas control y privadas de P exhibieron una pequeña proporción de sus proteínas modificadas postraduccionalmente por

nitración, es decir que mostraron un corrimiento en el espectro de +44,985 equivalente a una nitración simple.

Las tablas 4.8 y 4.9 describen las proteínas nitradas presentes en al menos dos muestras de cada uno de los tratamientos, mostrando los péptidos encontrados, el sitio de nitración, las proteínas asignadas y su gen. Siete proteínas se observaron nitradas en ambos tratamientos (Figura 4.27). Entre ellas, 4 proteínas fueron localizadas en el cloroplasto; las cadenas corta y larga de la RuBisCO, ferredoxina, y proteínas de unión a la clorofila. Algunas de ellas, como las subunidades de RuBisCO, fueron descritas como putativamente nitradas en condiciones controles en trabajos previos (Lozano-Juste y León, 2011).

Secuencia	Replicados	Proteínas	Genes
DY-nitro-KLTYTPDYETK LTYTPDY-nitro-ETKDTDILAAFR SQAETGEIKGHY-nitro-LNATAGTCEEMMK IPTAY-nitro-IKTFQGPPHGIQVER	3	<i>Ribulose biphosphate carboxylase large chain</i>	rbcl
ELQEAKTAY-nitro-PNGFIR KKFETLSY-nitro-LPDLDDAQLAK	3	<i>Ribulose biphosphate carboxylase small chain, chloroplastic</i>	RBCS-4 RBCS-1 547605 100500504
EVEY-nitro-LLRKGWIPCLEFELEHGFVYR	2		
LILKDPQDPSTPNAVSY-nitro-KTAAR	3	<i>Stem 31 kDa glycoprotein</i>  <i>Stem 28 kDa glycoprotein</i>	VSP25  VSPA
VGY-nitro-NPDKIPFVPISGFEGDNMIER	3	<i>Elongation factor 1-alpha</i>	TEFS1

LAVEDY-nitro-PYAVDGLIWDIAIK	3	<i>Lipoxygenase</i>	100815477
IYDYDVYNDLGNPDSGDKY-nitro-ARPVLGGSALPYPR	2		GLYMA_13G3 47800 547836
	2	<i>Linoleate 9S-lipoxygenase-4</i>	LOX1.5
SFYNRY-nitro-GGGVNTVSDGYNK	3	<i>Uncharacterized protein 99% identity with Aquaporin PIP2-7 (Zea mays)</i>	732581
VKY-nitro-LGPFSGEPSPSYLTGEFPGDYGWDTAGLSADPETFAR	3		GLYMA_05G1 28000
VKY-nitro-LGPFSGEPSPSYLTGEFPGDYGWDTAGLSADPETFAK	3	<i>Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic</i>	547819 100805310 lhcb1*7 GLYMA_16G1 65200 CAB3
AAEDPEFETFY-nitro-INNILLNEGIR	2	<i>Uncharacterized protein 94.6% identity with Photosystem II D2 protein (Arabidopsis thaliana)</i>	GLYMA_04G0 95000
IPEKLAFY-nitro-DYIGNNPAK Y-nitro-QWDQGYFQQEIYR	2	<i>Photosystem II CP47 reaction center protein</i>	psbB
WNYDGSSTGQAPGDDSEVILY-nitro-PQAIFKDPFR	2	<i>Glutamine synthetase</i>	100780873 548036
VTCM(+15.994900)ASY-nitro- KVKLITPEGEVEFECDDVFIVDK	2	<i>Ferredoxin</i>	100305932 100813636
RVQLADKY-nitro-LNEAALGDANQDAIK	2	<i>Uncharacterized protein 99.4% identity with RuBisCO activase (Glycine max)</i>	GLYMA_14G0 67000

**Tabla 4.8.** Proteínas nitradas identificadas en hojas de soja bajo condiciones control por *Shotgun* LC-MS/MS. La presencia del grupo nitro se determina mediante la detección de un corrimiento en el espectro de +44,985 compatible con la presencia de un grupo nitro en un residuo tirosina. Las proteínas nitradas halladas solo en una de las muestras no fueron incluidas en la tabla pero pueden consultarse en la tabla suplementaria 2: <https://owncloud.agro.unlp.edu.ar/owncloud/index.php/s/5KDYVPrqQcIGWk7>.

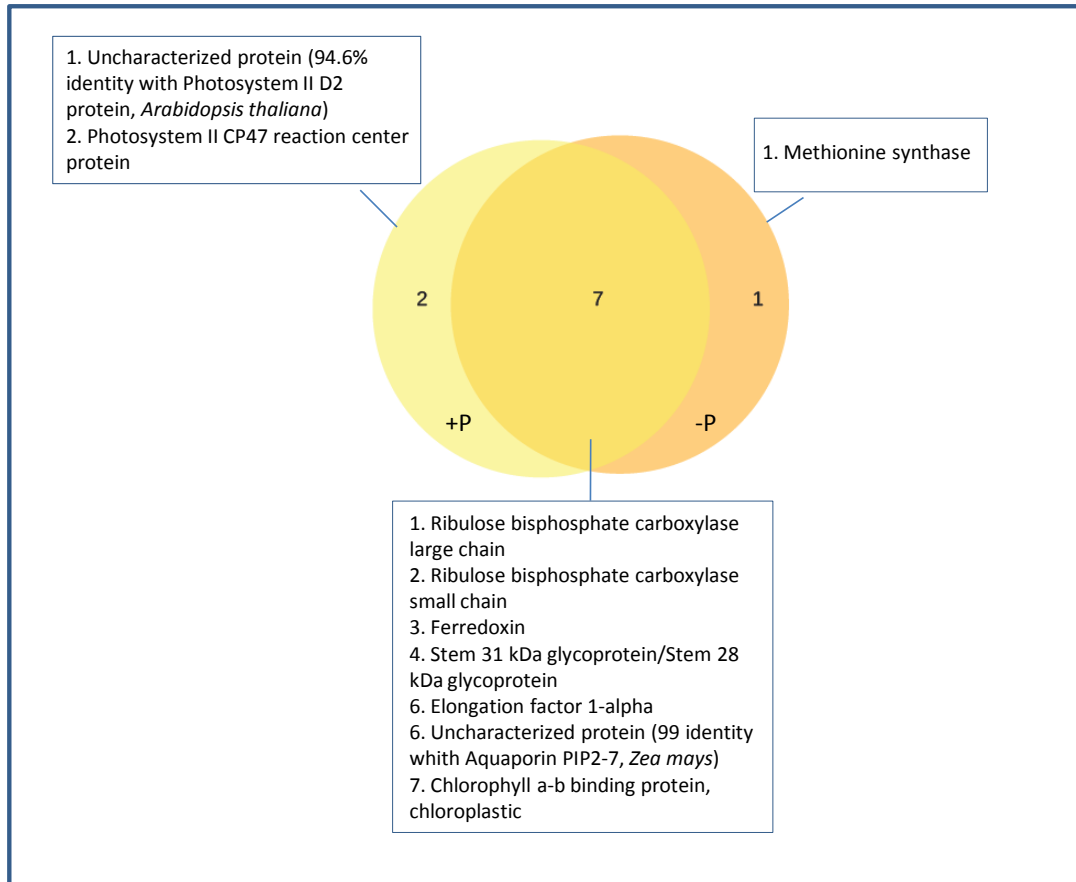
Secuencia	Replicados	Proteínas	Genes
DY -nitro-KLTYTPDYETK LTYTPDY-nitro-ETKDTDILAAFR SQAETGEIKGHY-nitro-LNATAGTCEEMMK	3	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	rbcl
ELQEAKTAY-nitro-PNGFIR	3	Ribulose biphosphate carboxylase small chain, chloroplastic	RBCS-4 RBCS-1 547605 100500504
VALVY-nitro-GQMNEPPGAR	3	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	atpB
VTCM(+15.994900)ASY-nitro-KVKLITPEGEVEFECDDVFIVDK	3	Ferredoxin	100305932 100813636
LILKDPQDPSTPNAVSY-nitro-KTAAR	3	Stem 31 kDa glycoprotein  Stem 28 kDa glycoprotein	VSP25 VSPA
VGY-nitro-NPDKIPFVPISGFEGDNMIER	3	Elongation factor 1-alpha	TEFS1 GLYMA_05G1 14900 100785429 100499630 GLYMA_05G0 89000 100776330 100801611
SFYNRY-nitro-GGGVNTVSDGYNK	2	Uncharacterized protein 99 % identity with Aquaporin PIP2-7 ( <i>Zea mays</i> )	732581



SEIPEYLTGEVPGDYG-nitro-DPFGLSKKPEDFAK SEIPEYLTGEVPGDY-nitro-GYDPFGLSKKPEDFAK	2	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	100806585 100820327
VKY-nitro-LGPFSGEPPSYLTGEFPGDYGWDTAGLSADPETFAR		Chlorophyll a-b binding protein, chloroplastic	GLYMA_05G1 28000
ALGVDTVPVLVGPVTY-nitro-LLLSKPAK	2	Methionine synthase	547643

**Tabla 4.9.** Proteínas nitradas identificadas en hojas de soja bajo condiciones de restricción de P, por Shotgun LC-MS/MS. La presencia del grupo nitro se determina mediante la detección de un cambio en el espectro de +44,985 compatible con la presencia de un grupo nitro en un residuo tirosina. Las proteínas nitradas halladas sólo en una de las muestras no fueron incluidas en la tabla pero pueden consultarse en la tabla suplementaria 3: <https://owncloud.agro.unlp.edu.ar/owncloud/index.php/s/P4MFeDNhI3dZVom>.

A pesar del incremento en los niveles de NO observado en las hojas provenientes de plantas en condición de restricción de P luego de 24 h de tratamiento, se observó sólo una proteína diferencialmente nitrada en esta condición, la metionina sintasa (Figura 4.27).



**Figura 4.27.** Diagrama de Venn de proteínas nitradas en hojas unifoliadas de soja provenientes de plantas control y expuestas a 24 h de restricción de P. Se consideran como nitradas exclusivamente en una condición a las proteínas nitradas que fueron observadas en al menos 2 de las réplicas de uno de los tratamientos y en ninguna de las réplicas del otro.

## Deficiencia de P en plantas de maíz y soja. Análisis comparativo de las respuestas tempranas a la restricción de P



### 4.3 Deficiencia de P en plantas de maíz y soja. Análisis comparativo de las respuestas tempranas a la restricción de P

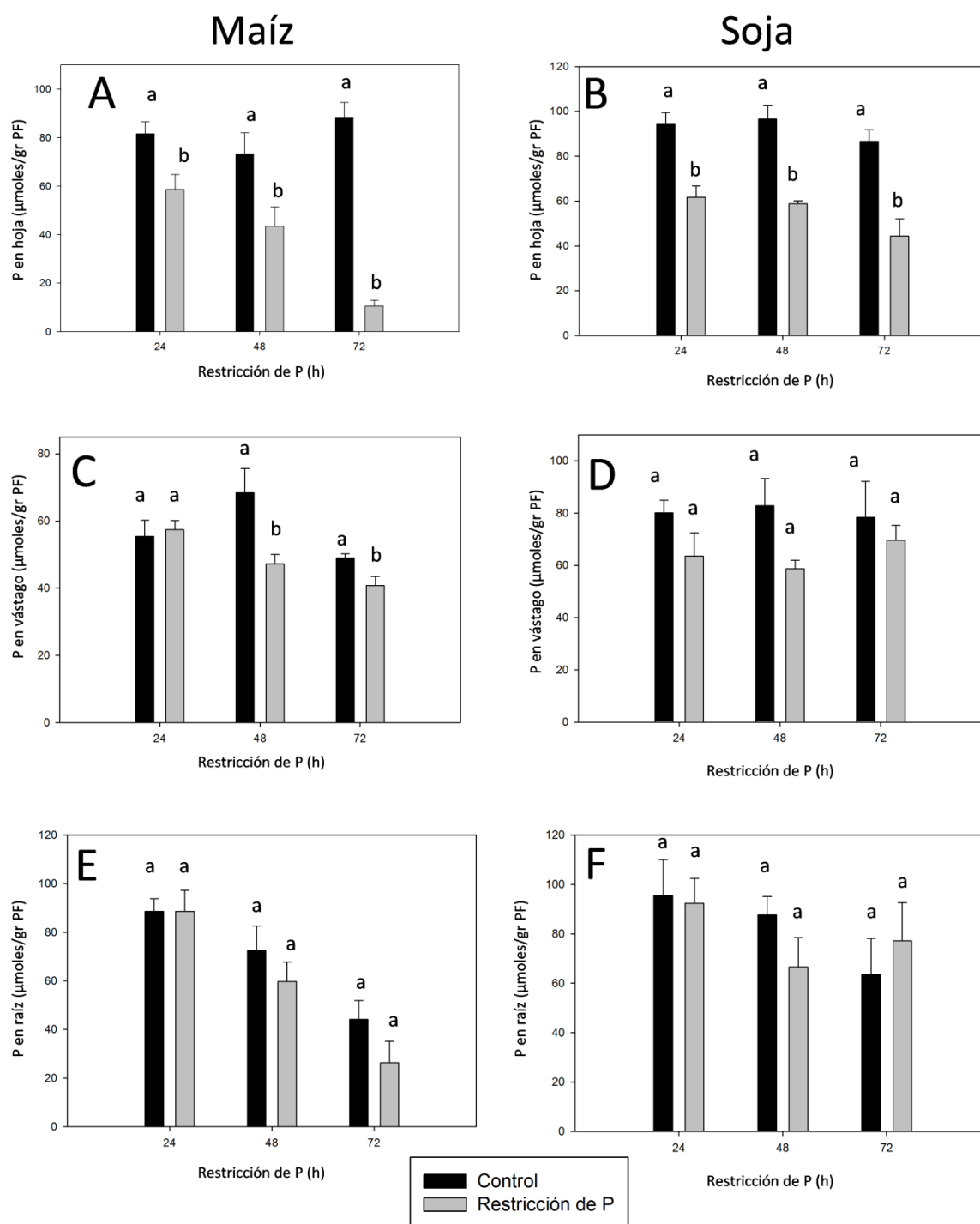
#### 4.3.1 Caracterización del contenido de P durante la restricción del nutriente

Las plantas de soja y maíz, luego de haber sido germinadas en cámara oscura durante 3 y 4 días respectivamente, crecieron durante 7 días en invernáculo, y fueron sometidas a 24, 48 y 72 h de déficit de P según se describió en Materiales y Métodos a fin de caracterizar la caída de la concentración de P durante las primeras horas de restricción.



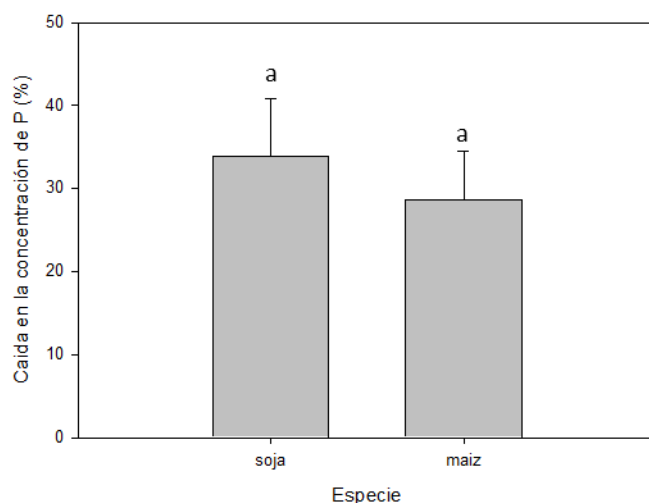
**Figura 4.28.** Imagen de las plantas de maíz y soja en el momento previo a la finalización de un ensayo.

En las hojas, tanto de maíz (hoja 2) como de soja (unifoliadas), se observa un decaimiento significativo en la concentración de P a partir de las 24 h, que se profundiza a medida que avanza el tiempo de restricción de P a las 48 y 72 h (Figura 4.29 A y B). En relación al vástago, que en ambos casos es considerado como todo el material vegetal restante una vez que se retira la raíz y las hojas (la hoja 2 en el caso del maíz y las hojas unifoliadas en el caso de la soja), se observa un decaimiento significativo en maíz a partir de las 48 h de restricción (Figura 4.29 C y D). Las raíces de ambas especies no presentan diferencias significativas de la concentración de P entre tratamientos para ninguno de los tiempos de restricción (Figura 4.29 E y F).



**Figura 4.29.** Efecto de la restricción de P sobre la concentración de P en hoja, vástago y raíz en plantas de maíz y soja. Plantas de soja y maíz, fueron sometidas durante 24, 48 y 72 h a dos niveles de P (0 y 0,5 mM). La concentración de P fue evaluada en: **A.** Hoja 2, **C.** Vástago y **E.** Raíz en plantas de maíz; y en: **B.** Hoja unifoliada, **D.** Vástago y **F.** Raíz en las plantas de soja. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar, los datos fueron analizados utilizando el ANOVA de una vía y el Post Hoc test de Tukey. Las letras diferentes expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos a un mismo tiempo de restricción de P ( $p < 0,05$ ).

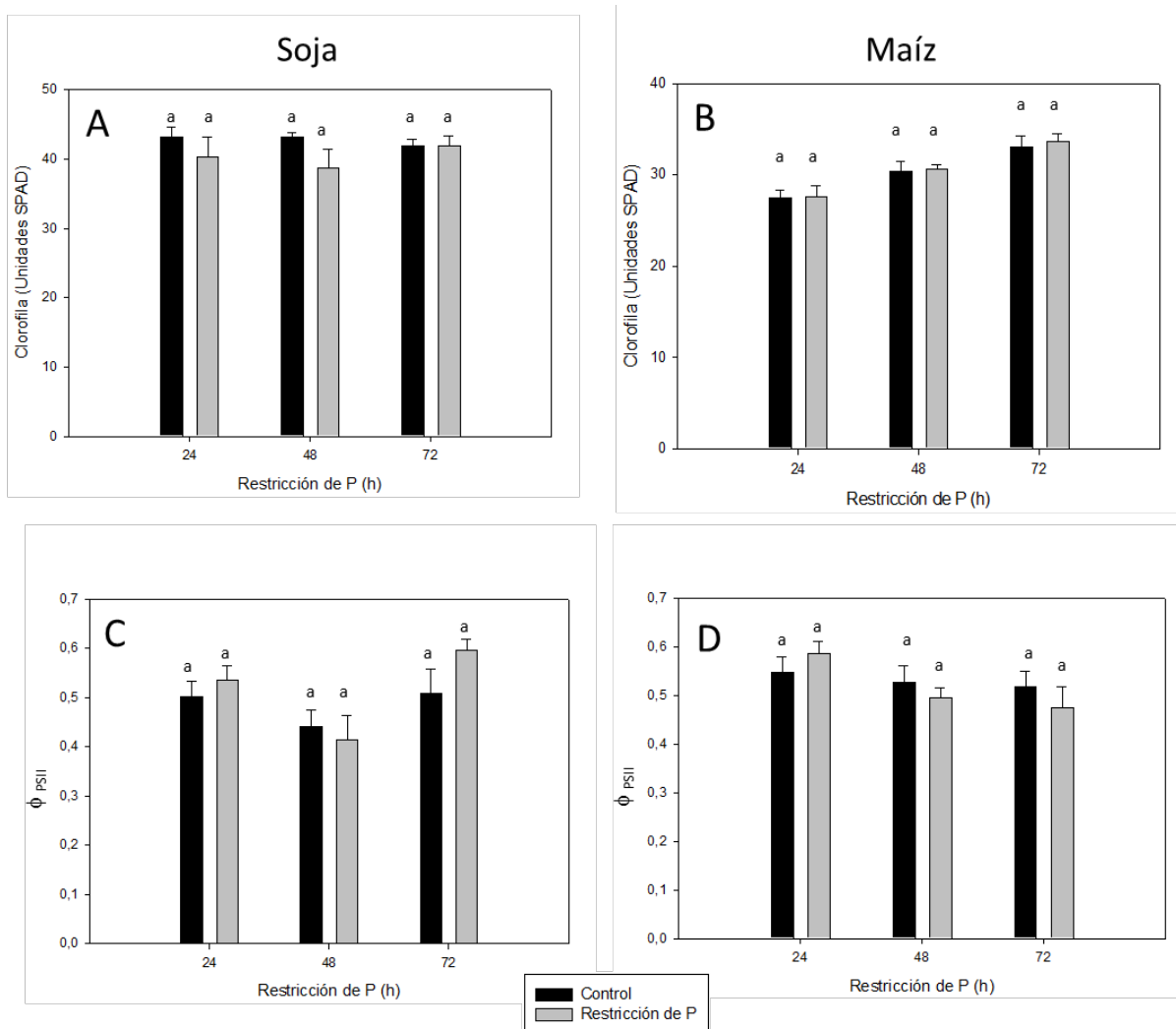
Es importante aclarar que en el momento de la medición, las plantas de soja solo presentaban desplegadas las hojas unifoliadas, pero las plantas de maíz presentaban hasta 4 hojas, aunque no todas totalmente desplegadas. Sin embargo, la concentración de P evaluada en la hoja 3 de las plantas de maíz en condiciones controles y de restricción de P a las 24 h, no evidenció una caída significativa en la concentración del nutriente ( $73 \pm 4$  y  $68 \pm 4$   $\mu\text{moles P/g PF}$  respectivamente). Para llevar adelante las mediciones y observaciones bioquímicas y fisiológicas subsiguientes, se decidió utilizar la hoja 2 en las plantas de maíz ya que la caída de la concentración de P resultó comparable a la registrada en las hojas unifoliadas de soja. En este sentido, se observó que no hay diferencias en la magnitud del decaimiento en la concentración de P entre ambas especies (Figura 4.30) y en base a esta información se prosiguieron con algunas de las mediciones en hoja unifoliada de soja y hoja 2 de maíz con 0 y 24 h de restricción de P según se describió en materiales y métodos (Figura 3.3).



**Figura 4.30.** Decaimiento en la concentración de P a las 24 h de restricción del nutriente en hojas de maíz y soja. Plantas de soja y maíz, fueron sometidas durante 24h a dos niveles de P (0 y 0,5 mM). El porcentaje refleja la caída en la concentración de P en relación a la condición de suficiencia (control) en la hoja 2 de plantas de maíz y las hojas unifoliadas de plantas de soja. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar, los datos se obtuvieron de la diferencia entre valores pareados aleatoriamente y fueron analizados utilizando el test t de Student y el Post Hoc test de Tukey. Las letras diferentes expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

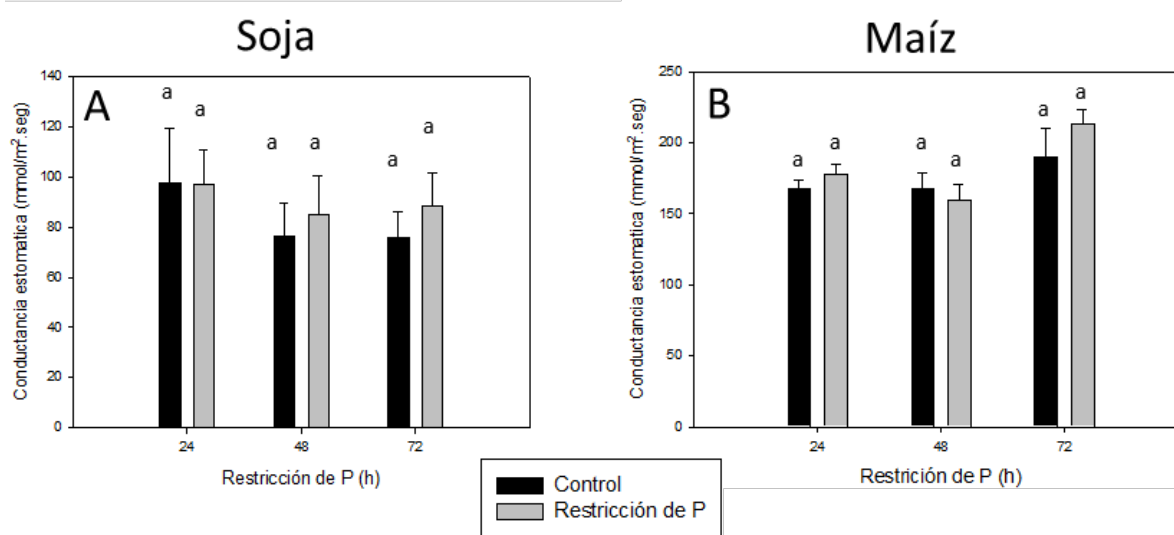
### 4.3.2 Fotosíntesis y otros parámetros fisiológicos

A fin de determinar si a tiempos cortos de restricción de P existe un impacto en los parámetros fotosintéticos en la plantas de maíz y soja bajo las condiciones experimentales descritas anteriormente, se evaluó indirectamente el contenido de clorofila utilizando un medidor de SPAD y el rendimiento cuántico del fotosistema II ( $\Phi$ PSII) utilizando un fluorímetro. No se observaron diferencias significativas en las mediciones de ninguno de los dos parámetros asociados a la fotosíntesis entre las plantas en condición de suficiencia y las plantas sometidas a restricción de P para ninguno de los tres tiempos ensayados (24, 48 y 72 h), en ninguna de las dos especies (Figura 4.31), evidenciando que la caída de la concentración de P en los tejidos no generó un impacto en la fotosíntesis a los tiempos evaluados en el presente trabajo.



**Figura 4.31.** Efecto de la restricción de P sobre parámetros fotosintéticos en plantas de maíz y soja. Plantas de soja y maíz, fueron sometidas durante 24, 48 y 72 h a dos niveles de P (0 y 0,5 mM). Se midieron **A.** Las unidades SPAD como estimación del contenido de clorofila en hojas de soja, **B.** El  $\phi$ PSII en hojas de soja **C.** Las unidades SPAD como estimación del contenido de clorofila en hojas de maíz, **D.** El  $\phi$ PSII en hojas de maíz. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar, los datos fueron analizados utilizando el ANOVA de una vía y el Post Hoc test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

El intercambio gaseoso representa otro parámetro fisiológico importante como macro indicador de cambios que pueden estar ocurriendo a varios niveles del metabolismo de la planta. En las condiciones experimentales desarrolladas en este capítulo, no se registraron diferencias significativas en la conductividad estomática de las hojas ni en las plantas maíz ni en las de soja a ninguno de los tres tiempos evaluados (Figura 4.32).



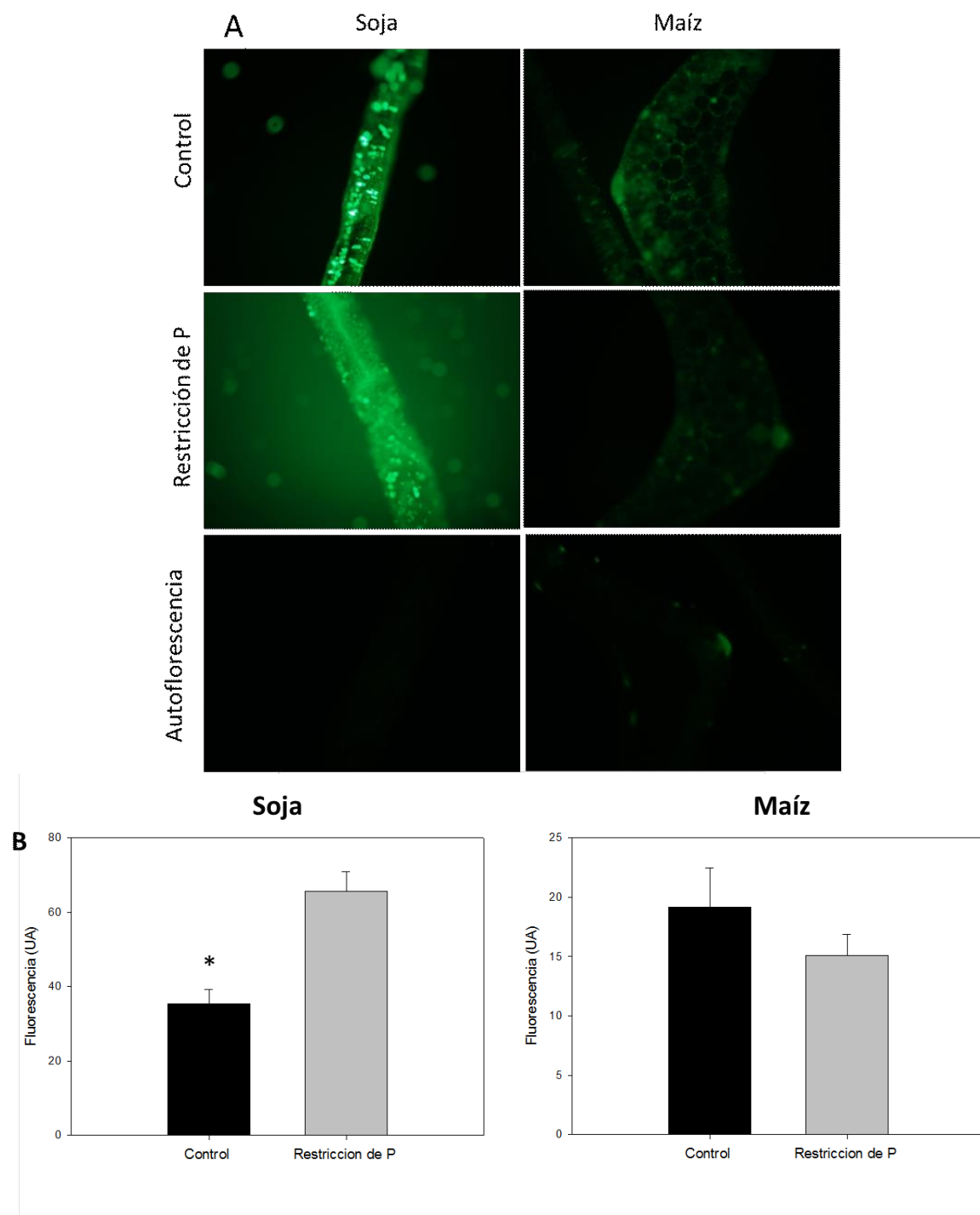
**Figura 4.32.** Conductancia estomática en plantas de soja y maíz. Plantas de soja y maíz, fueron sometidas durante 24, 48 y 72 h a dos niveles de P (0 y 0,5 mM). Se midió la conductancia estomática utilizando un porómetro y los valores se expresaron en mmol H<sub>2</sub>O/m<sup>2</sup>seg para **A.** Las hojas de soja, y **B.** Las hojas de maíz. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar, los datos fueron analizados utilizando el ANOVA de una vía y el Post Hoc test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### 4.3.3 Efecto de la restricción de P sobre el contenido de NO

De acuerdo a los resultados presentados anteriormente, las plantas de soja creciendo en cámara de cultivo y sometidas a deficiencia de P presentaron un aumento en el contenido de NO a partir de las 15 h de deficiencia del nutriente (Figura 4.24). A fin de evaluar de forma comparativa la



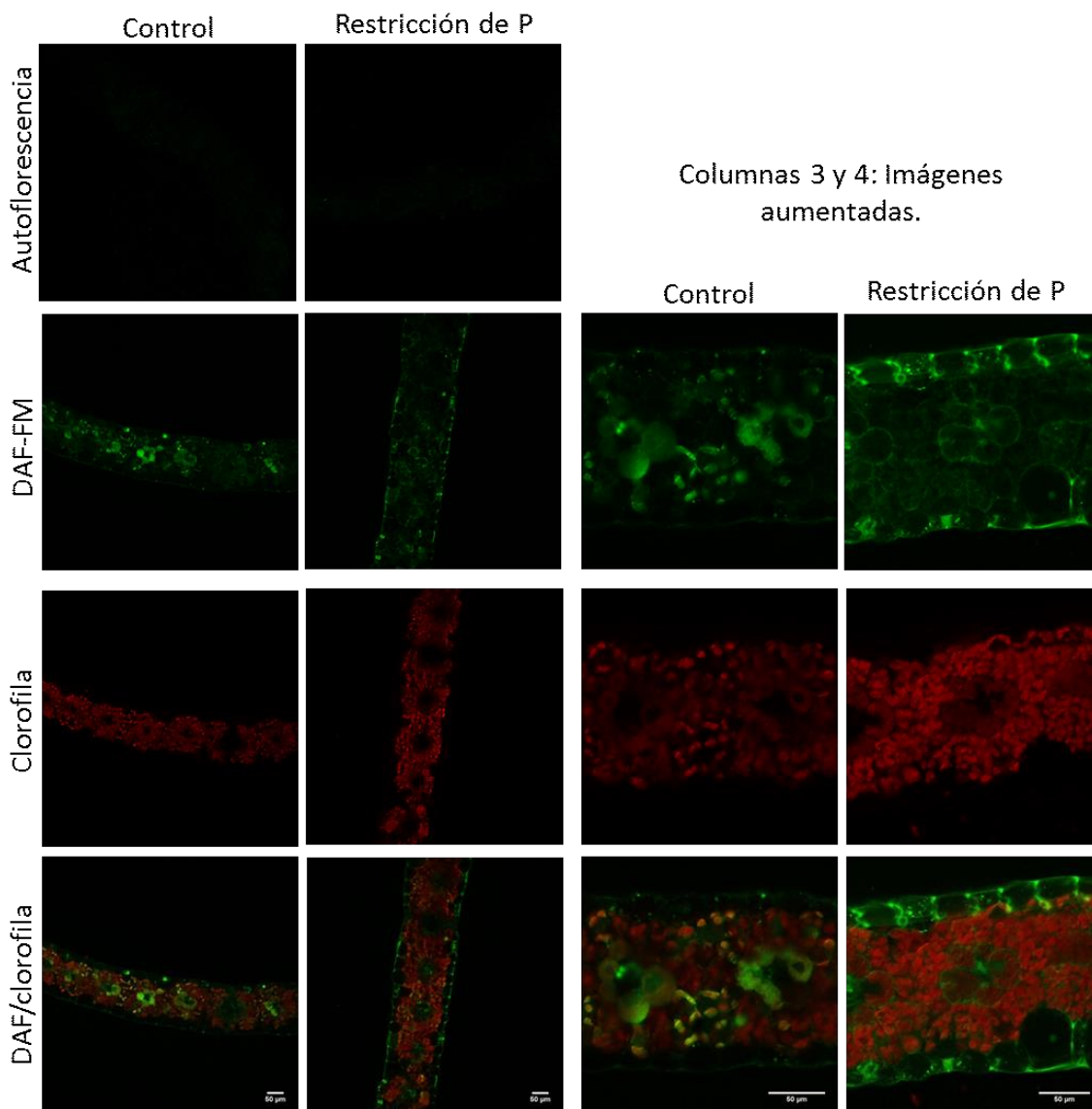
respuesta de las plantas de maíz y soja a la restricción de P en las condiciones de crecimiento en invernáculo, se evaluó la presencia de NO en las hojas unifoliadas de soja y la hoja 2 de maíz, mediante la observación en microscopio de epifluorescencia empleando de la sonda fluorescente DAF-FM DA. Se observó que la restricción de P indujo una mayor presencia de NO en las hojas de soja, al igual que lo evidenciado en el apartado previo (Punto 4.2.3) durante el crecimiento en cámara de cultivo. Sin embargo, en el caso del maíz no se evidenció la misma respuesta sino que por el contrario, la presencia de NO pareciera reducirse en particular en las células de la vaina (Figura 4.33 A). La figura 4.33 B muestra la integración de la fluorescencia de las imágenes obtenidas haciendo uso del programa Image-J. El análisis estadístico de los datos obtenidos a partir de la integración de las imágenes evidencia un aumento significativo de la presencia de NO en las hojas de soja expuestas a 24 h de restricción de P en relación a las plantas controles, mientras que en el caso de maíz no se observan diferencias significativas, y por el contrario, se observa una tendencia a la reducción de la concentración de NO en condición de restricción de P.



**Figura 4.33.** Detección de NO en hojas de maíz y soja. Plantas de soja y maíz, fueron sometidas durante 24h a dos niveles de P (0 y 0,5 mM). Hojas provenientes de plantas controles y tratadas con 24 h de restricción de P (-P) fueron incubadas en DAF-FM DA 17  $\mu$ M por 30 minutos, lavadas y observadas en microscopio ( $\lambda$  excitación = 450-490nm y  $\lambda$  emisión = 500--550nm). Se incluyen imágenes de tejidos incubados en ausencia de la sonda fluorescente para descartar posible presencia de autofluorescencia en los tejidos. **A.** En la imagen se observa la presencia de NO en color verde, las imágenes son representativas de dos experimentos independientes. **B.** Análisis de la intensidad de la fluorescencia por unidad de área para cortes de hoja unifoliada de soja y hoja 2 de maíz a las 24h de restricción de P. Las imágenes obtenidas por microscopia de

fluorescencia fueron integradas utilizando el programa Image-J. Las barras expresan el valor medio  $\pm$  el error estándar, los datos fueron analizados utilizando el ANOVA de una vía y el Post Hoc test de Tukey. Las letras diferentes expresan la existencia de diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

En las plantas de maíz (C4) dos tipos diferentes de células están implicadas en la fotosíntesis, las células del haz de la vaina agrupadas alrededor de los tejidos de conducción de las hojas y las células del mesófilo. Es interesante mencionar que los cloroplastos totalmente diferenciados de ambos tipos de células acumulan un conjunto distinto de enzimas fotosintéticas y proteínas que les permiten colaborar en la fijación de carbono (Hatch y Osmond, 1976; Majeran y col., 2005). La enzima RuBisCO se acumula exclusivamente en los cloroplastos de las células del haz de la vaina, mientras que la piruvato fosfato dikinasa (PPDK) y el fotosistema II se acumulan en los cloroplastos del mesófilo. Por lo tanto puede ocurrir que la distribución de NO no resulte homogénea en las plantas de maíz y que incluso diferentes fuentes puedan estar implicadas en la generación de esta especie en los distintos tipos celulares, y que además resulten diferencialmente moduladas durante la deficiencia de P. Para poder avanzar en la interpretación de los cambios observados en las plantas de maíz, se llevaron adelante mediciones del contenido de NO en los tejidos empleando la técnica de microscopia confocal utilizando la misma sonda fluorescencia (DAF-FM DA). En la Figura 4.34 se observa que en condiciones de suficiencia nutricional las células de la vaina presentan una mayor cantidad de NO que las células del mesófilo. Al ser sometidas a restricción de P durante 24 h, la presencia de NO parece reducirse en las células de la vaina. Sin embargo, también parece observarse una co-localización de la fluorescencia verde (correspondiente a la detección de NO) y la fluorescencia roja (autofluorescencia de clorofila) en las células del mesófilo, indicando que al menos una parte de la generación de NO podría estar localizada en los cloroplastos del mesófilo.

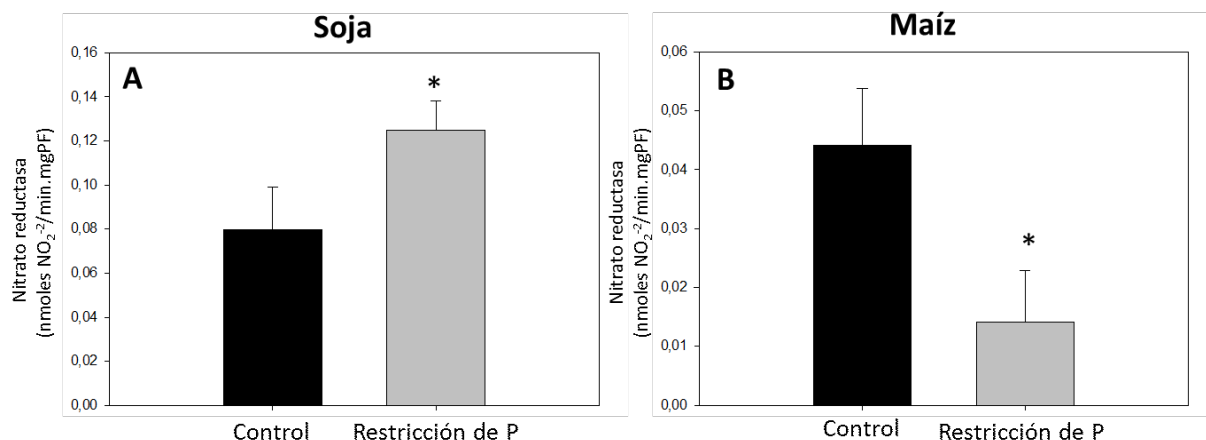


**Figura 4.34.** Detección de NO en hojas de maíz. Hojas provenientes de plantas controles y sometidas a 24 h de restricción de P fueron incubadas en presencia de DAF-FM DA 17  $\mu$ M por 30 minutos, lavadas y observadas en microscopio laser confocal ( $\lambda$  excitación = 488 nm y  $\lambda$  emisión = 500-525 nm). En la imagen se observa la presencia de NO en color verde y la autofluorescencia de clorofila en rojo ( $\lambda$  excitación = 488 nm y  $\lambda$  emisión = 670-730 nm). Las imágenes son representativas de dos experimentos independientes, las columnas 3 y 4 muestran las imágenes con mayor aumento. Las barras de referencia para la escala indican 50  $\mu$ m.

#### 4.3.4 Efecto de la restricción de P sobre la actividad de la enzima NR

Debido a que la actividad de la NR es una de las posibles vías propuestas de generación de esta especie reactiva del nitrógeno, se decidió evaluar en forma comparativa la actividad de misma en

las plantas de maíz y soja bajo las mismas condiciones de crecimiento y restricción de P. La medición de la actividad NR *in vivo*, arrojó diferencias en el mismo sentido que las variaciones en los niveles de NO mostrados previamente. En el caso de las hojas unifoliadas de soja se evidenció un aumento significativo en la actividad NR en condiciones de restricción de P, simultáneamente en la hoja 2 de maíz la actividad NR disminuyó significativamente en hojas sometidas a restricción de P (figura 4.35).



**Figura 4.35.** Actividad de la enzima NR *in vivo* en **A.** hoja unifoliada de soja y **B.** hoja 2 de maíz y provenientes de plantas controles y sometidas a 24 h de restricción de P. Plantas de 10 u 11 días de edad desde el inicio de la germinación (7 días en maceta), según se trate desoja o maíz, fueron sometidas durante 24h a dos niveles de P (0 y 0,5 mM). Los datos fueron analizados por test t de Student para determinar diferencias significativas entre los tratamientos. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ).

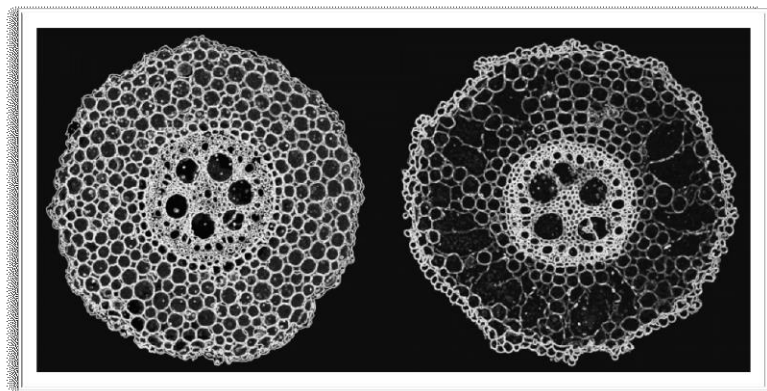
De acuerdo a los resultados mostrados anteriormente, las plantas de maíz parecen comportarse de manera distinta a las plantas de soja en relación con el contenido de NO en las hojas sometidas a restricción de P. En las mismas, además de observarse una tendencia a la reducción de la presencia de NO en el tejido, pareciera también observarse un cambio en la distribución del mismo. En este sentido, cabe mencionar que las plantas de maíz (C4) y soja (C3) presentan diferencias estructurales y bioquímicas en relación con el proceso de fotosíntesis.

En conjunto los resultados obtenidos abren múltiples interrogantes acerca de las diferencias observadas durante la restricción temprana de P en ambos tipos de plantas. La generación de NO podría tener un rol importante durante las primeras horas de restricción de P en las plantas de soja, como fue evidenciado previamente en las condiciones de crecimiento en cámara de cultivo. En el caso de las plantas de maíz, el NO parece tener un rol fundamental en las respuestas de

aclimatación a más largo término de acuerdo a los resultados obtenidos en la sección 4.1. Sin embargo a tiempos cortos de restricción la generación de NO parece afectarse en una primera instancia en las hojas debido a la restricción de P en el medio de cultivo. Las diferencias bioquímicas y estructurales entre ambos tipos de plantas podrían ayudar a dilucidar las diferencias observadas en las respuestas a la deficiencia de P, al menos en cuanto a la generación de NO y sus posibles fuentes.

# DISCUSIÓN

---



## 5.1 Deficiencia de P en plantas de Maíz. Efecto de la exposición de las plantas a dadores de óxido nítrico

La adquisición de P por parte de las plantas es un paso crítico para su desarrollo en suelos con baja disponibilidad del nutriente. Las plantas superiores han desarrollado numerosas adaptaciones que les permiten aclimatarse a bajas condiciones de disponibilidad del nutriente mediante mejoras en la eficiencia de utilización y en la capacidad de adquisición del mismo a partir de sustratos de baja concentración (Rose y col., 2013; Vance y col., 2003). Los mecanismos de transducción de señales que relacionan la escasa disponibilidad de P en el suelo con las respuestas fisiológicas todavía no se conocen en profundidad, siendo la participación del NO en los mismos un área de investigación actualmente muy dinámica (Simontacchi y col., 2015).

El NO generado endógenamente o provisto desde el medio externo participa en numerosos procesos, entre los que se encuentra la acción atenuante de algunas situaciones de estrés abiótico como pueden ser los déficit nutricionales (Du y col., 2015; Foresi y col., 2015). La idea de evaluar el rol del NO en las respuestas de las plantas al déficit de P, surge a partir de informes previos que muestran un incremento en los niveles de NO endógenos cuando plantas de diferentes especies como lupino blanco, *Arabidopsis* y arroz son expuestas a condiciones de déficit de P (Royo y col., 2015; Wang y col., 2010; Zhu y col., 2017), incremento que también fue evidenciado en las plantas de maíz expuestas a restricción de P durante 21 días (Figura 4.3). Por otra parte, existencia de trabajos que asocian al NO con ciertas respuestas de aclimatación al déficit de P como son la formación de las denominadas *cluster roots* (Meng y col., 2012), la exudación de citrato y otros ácidos orgánicos por las raíces (Wang y col., 2010), la modificación de la distribución de P dentro de la planta (Zhu y col., 2017) así como también modificaciones en procesos metabólicos (Royo y col., 2015), generaron el interés sobre la posible interacción del NO con otras respuestas de las plantas al déficit de P.

En esta tesis se muestran resultados experimentales que buscan caracterizar el rol desempeñado por el NO en las respuestas de las plantas de maíz al déficit de P. Se pudo observar como la adición de fuentes exógenas de NO generó incrementos significativos en la capacidad de las raíces para acidificar el medio de cultivo (Figura 4.16), la actividad de enzimas fosfatasa ácidas en tejidos de la raíz (Figura 4.12), la capacidad instantánea de las raíces para captar P a partir de medios con muy baja concentración del nutriente (Figura 4.17), como así también una tendencia no



significativa al incremento de la actividad de las enzimas fosfatasa en la solución nutritiva en la que son cultivadas las plantas (Figura 4.14). Las anteriormente mencionadas son respuestas al déficit de P previamente caracterizadas (Vance y col, 2003), de las cuales hasta el momento no se conocía que fueran moduladas por el NO.

### 5.1.1 Establecimiento y caracterización de la deficiencia de P: Efecto de la adición de GSNO

Al analizar los resultados obtenidos a partir de los experimentos desarrollados en el marco de esta tesis, a los 21 días de tratamiento, las plantas evidenciaron diferencias significativas en la acumulación de P en sus tejidos (Figura 4.1 A), la distribución de biomasa (Figura 4.1 B) y contenido de antocianinas (Figura 4.2), así como la tasa de aparición de hojas o *filocrono*, utilizada como índice para determinar el grado de desarrollo (Figura 4.6). Estos datos nos permitieron corroborar que bajo las condiciones experimentales desarrolladas en este trabajo de tesis luego de 21 días de tratamiento la deficiencia de P resultó bien establecida en las plantas de maíz. Sin embargo, también se realizaron mediciones y ensayos para evaluar algunas respuestas tempranas en plantas expuestas a 6 días de déficit de P. La decisión de llevar adelante las mediciones a los 6 días fue tomada a partir del criterio establecido por Cogliatti y Clarkson, (1983), quienes describieron respuestas fisiológicas al déficit de P cuando las plantas presentaban un 20% de restricción del crecimiento. En nuestras condiciones experimentales el déficit de P se tradujo al día 6 de tratamiento en una diferencia de 20% en el crecimiento longitudinal de las plantas. Los tratamientos con GSNO como dador de NO sobre las plantas restringidas en P, no dieron lugar a diferencias significativas para la acumulación de P, distribución de biomasa, contenido de antocianinas y *filocrono* previamente mencionados.

La eficiencia de utilización del P (Efficiency Phosphorus Utilization, EPU para sus siglas en ingles), es una herramienta potente para poder caracterizar la dinámica de la utilización del P por parte de la planta y determinar si esta dinamica es modificada por el suministro de P al cual la planta se ve expuesta y, en nuestro caso, también por el agregado del dador de NO. En términos generales, las EPU nos permiten relacionar la economía del carbono con la economía del P dentro de la planta. Existen numerosas fórmulas que buscan representar matemáticamente los diferentes criterios que pueden utilizarse para definir las eficiencias de uso de los nutrientes (ENU) en general y la EPU en

particular (Rose y Wissuwa, 2012; Santa-María y Moriconi, 2015). En concordancia con los conceptos vertidos por Santa-Maria y col., (2015), las EPU solo fueron calculadas en plantas sometidas a déficit nutricional, ya que en condiciones de suficiencia, la expresión de la eficiencia de uso pierde su valor conceptual, puesto que los tejidos no encuentran la disponibilidad de P como limitante y las diferencias observadas en la EPU solo evidenciarían cambios en el stock del nutriente almacenado por los tejidos en la vacuola (Lee y col., 1990).

Los resultados sugieren que la adición de NO en la solución nutritiva durante los 21 días de deficiencia de P se traducen en una reducción en la eficiencia de utilización del P en la planta entera (Tabla 4.2). Una posible interpretación de la reducción que se manifiesta en las  $EPU_u$ ,  $EPU_i$ ,  $EPU_e$  puede hacerse a partir de la caída no estadísticamente significativa, pero observable, de la acumulación de biomasa tanto en raíz como en vástago de plantas en condición de déficit de P tratadas con GSNO (Figura 4.5).

### 5.1.2 Efecto de la adición de GSNO sobre la clorofila

La producción de biomasa en las plantas depende de la fotosíntesis, y en la fotosíntesis desempeñan un papel fundamental compuestos fosforados como el ATP, NADPH, azúcares fosfato, ácidos nucleicos y fosfolípidos.

Un uso eficiente del P en la fotosíntesis potencialmente afecta la EPU (Veneklaas y col., 2012), ya que permite fijar más carbono al optimizar el uso del P que actúa, en este caso, como factor limitante. En esta tesis pudimos observar que, en las condiciones experimentales utilizadas, el déficit de P afecta el contenido de clorofila especialmente en las hojas más viejas (Figura 4.9 A), como así también el rendimiento cuántico del fotosistema II (Figura 4.9 B). El impacto sobre el contenido de clorofila en las hojas se hace significativo una vez que el déficit está bien establecido haciéndose evidentes mediante mediciones de SPAD diferencias en la hoja 1 a los 14 días de déficit y en la hoja 2 recién a los 18 días (Figura 4.8), y no observándose diferencias a tiempos cortos, en coincidencia con trabajos previos que describen la ausencia de clorosis por exposición a 12 días de déficit de P (Cakmak y col., 1994).

En función del mantenimiento de la funcionalidad fotosintética, la conservación de los niveles de clorofila en los tejidos es una variable importante aunque no la única. Previamente ha sido

descrito un efecto protector del NO sobre los niveles de clorofila (Laxalt y col., 1997; Zhang y col., 2006), probablemente mediante el incremento de la disponibilidad de hierro requerido para la síntesis de clorofila (Buet y Simontacchi, 2015), o producto de la inhibición del catabolismo de la clorofila (Liu y Guo, 2013). En el mismo sentido, la expresión de la flavohemoglobina Hmp reduce la concentración de NO, induce la senescencia y consecuente degradación de la clorofila en *Arabidopsis*, efecto que fue revertido por la aplicación de NO exógeno (Mishina y col., 2007). El aumento del NO endógeno produce un incremento del verdor de las plántulas de cebada, el cual a su vez es favorecido por el agregado de NO exógeno (Zhang y col., 2006). El incremento del contenido de clorofila mediado por el NO se potencia también cuando las plantas son expuestas a pulsos de luz, laceraciones y distintos tipos de estrés abiótico (Beligni y Lamattina, 2000). Por otro lado, el NO favorece el mantenimiento de los niveles de clorofila frente a situaciones de stress que conducen a la clorosis (Beligni y Lamattina, 1999; Laspina y col., 2005; Laxalt y col., 1997).

En esta tesis se observó que la adición de GSNO a la solución nutritiva ayudó a mantener los valores de clorofila en las plantas expuestas a déficit de P (Figura 4.8 y 4.9 A), esta retención del contenido de clorofila en las hojas de las plantas sometidas a déficit de P cuando son tratadas con GSNO podría explicarse mediante la existencia de un mecanismo de señalización a distancia que genere un efecto en las hojas a partir del tratamiento aplicado en las raíces.

La caída del rendimiento cuántico del fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) producto del déficit de P, no se afectó a causa del tratamiento con NO exógeno (Figura 4.9 B). Esto podría deberse a una inhibición de los mecanismos del proceso fotosintético posteriores a la excitación lumínica de la clorofila, donde la baja disponibilidad de P en el cloroplasto reduce la síntesis de ATP a través de la actividad ATP sintasa por falta de sustrato. Al reducirse la actividad de esta enzima transmembrana, se reduce también el transporte de  $H^+$  que se acumulan en el lumen tilacoidal, acidificándolo, inhibiendo la actividad hidrolítica del fotosistema II y en consecuencia su rendimiento cuántico (Carstensen y col., 2018). Al verse limitada la regeneración de la ribulosa-1,5-bifosfato dependiente de ATP en el ciclo de Calvin, se reduce la asimilación de  $CO_2$  (Yan y col., 2015) y la consecuente generación de biomasa.

### 5.1.3 Efecto de la adición de GSNO sobre la actividad de enzimas antioxidantes

El déficit de P induce estrés oxidativo y formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en plantas (Hernández y Munné-Bosch, 2015), además la actividad de enzimas que forman parte del sistema antioxidante aumenta como respuesta al déficit de P en plantas de maíz (Tewari y col., 2004; Yao y col., 2007). Es posible que en condiciones de estrés oxidativo, el NO genere un incremento de la respuesta antioxidante, como puede observarse en el estrés inducido por déficit de hierro en hojas de plantas de maíz (Sun y col., 2007).

En los experimentos desarrollados en este trabajo de tesis, la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en raíz no se vio significativamente afectada por el déficit de P, sin embargo, la actividad ascorbato peroxidasa (APX) se incrementó durante el déficit. Este incremento puede ser una respuesta al incremento de los niveles de  $H_2O_2$  bajo condiciones de déficit de P (Shin y col., 2005) y a los cambios en la distribución de las ROS en la zona apical de la raíz debido a la exposición a condiciones de déficit de P (Tyburski y col., 2009).

El efecto del NO sobre las actividades SOD y APX ya fue descrito bajo diversas condiciones de estrés abiótico (Santa-Cruz y col., 2014; Du y col., 2015; Laspina y col., 2005; Shin y col., 2005); y en esta tesis evaluamos los efectos de la exposición de las plantas de maíz al dador de NO, GSNO sobre la actividad de las enzimas SOD y APX en condiciones de déficit y suficiencia de P (Figura 4.10). Bajo las condiciones experimentales empleadas en este trabajo, la actividad APX se incrementó como consecuencia del tratamiento con GSNO tanto en las plantas control como en las plantas sometidas a déficit de P. Este resultado guarda relación con reportes previos que describen la inhibición de la actividad APX mediada por inhibidores de la síntesis de NO y la recuperación de la actividad enzimática ante el agregado de NO exógeno, por lo que se postula que el NO actúa aguas arriba en la regulación de la actividad APX (Ullah y col., 2016). En el plano molecular, el incremento de la actividad APX por los dadores de NO podría deberse a la *s*-nitrosilación de la proteína (Correa-Aragunde y col., 2015). Es importante agregar que la inducción de la actividad APX por el NO se ha observado también en otras especies y tejidos, como por ejemplo en nódulos de raíces de soja (Keyster y col., 2011).

Por otro lado, la actividad SOD fue significativamente reducida en condiciones de suficiencia y déficit de P por el agregado del dador de NO. En este sentido los resultados son concordantes con

informes previos que hacen referencia a la inactivación de la enzima producto de la nitración del residuo tirosina en diferentes sistemas (Demicheli y col., 2007; Martinez y col., 2014).

Futuros estudios permitirán dilucidar si los cambios observados en este trabajo se deben a cambios en la expresión o en la actividad debido a modificaciones postraduccionales en las proteínas estudiadas.

#### **5.1.4 Efecto de la adición de GSNO sobre la actividad de enzimas fosfatasa ácidas**

La disponibilidad del P edáfico para las plantas está condicionada, entre otros muchos factores, por la retención del mismo en compuestos orgánicos que constituyen formas no asimilables por las raíces. El exudado de fosfatasa ácida al medio rizosférico es un mecanismo que permite a las plantas hidrolizar P orgánico para liberar P inorgánico asimilable (Gaume y col., 2001), degradando los ésteres fosfato no asimilables presentes en el suelo (González-Muñoz y col., 2015).

Las fosfatasas también pueden tener un rol en el medio intracelular, donde participan de la remobilización y el reciclado del P bajo condiciones de déficit y durante la senescencia (Shane y col., 2014). En estas situaciones los grupos fosfato que forman parte de macromoléculas, principalmente ARN y fosfolípidos, son liberados y redistribuidos a tejidos en crecimiento o utilizados para otras funciones en las células. Ambas fosfatasas, tanto las excretadas como las intracelulares tienden a aumentar bajo condiciones de deficiencia de P (Tran y col., 2010). En esta tesis pudimos observar como bajo las condiciones experimentales descritas, la actividad de las fosfatasas ácidas en la raíz se incrementa al menos 4 veces luego de 21 días de restricción de P, y que la misma resultó fuertemente influenciada por la presencia del dador de NO, que generó un incremento de la actividad únicamente bajo condiciones de déficit de P (Figura 4.13). Resulta muy interesante que el incremento de la actividad de las enzimas fosfatasas que se genera por el agregado de NO, solo se evidencie luego de un largo plazo (21 días) de tratamiento, siendo indetectable cuando el déficit es de 6 días (Figura 4.12), circunstancia en la cual solo se observan diferencias significativas como resultado del tratamiento de déficit de P. Estos resultados sugieren un rol dependiente del tiempo en esta respuesta de aclimatación a la deficiencia de P mediada por el NO. A su vez, el incremento de la actividad enzimática, producto del agregado de NO, no se

evidencia cuando las plantas se encuentran en condición de suficiencia de P, permitiendo inferir que el efecto provocado por el NO requiere de una situación previa generada por la condición de déficit de P.

En el plano molecular, el incremento en la actividad enzimática de las fosfatasa ácidas podría estar siendo regulado a nivel de la transcripción, como se puede observar en el análisis de transcritos en raíces de maíz sometidas a deficiencia de P llevado adelante por Calderon-Vazquez y col. (2008) o por vías post-transcripcionales, como fue descripto para la isoenzima AtPAP26 cuya actividad se incrementa frente al déficit de P en *Arabidopsis* sin cambios en la abundancia de transcritos (Tran y col., 2010).

Para profundizar acerca de la naturaleza del efecto del NO sobre la actividad de las fosfatasa ácidas, se desarrolló un ensayo complementario *in vitro*; donde homogeneizados de raíces provenientes de plantas de 21 días expuestas o no a restricción de P, fueron tratados directamente con GSNO. En este caso no se observaron cambios en la actividad enzimática (Figura 4.13) sugiriendo que el efecto del NO no está asociado a una activación directa de las enzimas por nitración o nitrosilación de la proteína. De todas formas este ensayo podría no reflejar la situación que ocurre *in vivo*, donde las proteínas están expuestas a concentraciones locales y a entornos diferentes de los ensayados en el laboratorio.

En un gran número de especies se han observado diferencias significativas en la actividad de las enzimas fosfatasa en el medio rizosférico debido a la secreción de las enzimas cuando las plantas son sometidas a condiciones de déficit de P (Tadano y col., 1993). A fin de evaluar la posibilidad de que las enzimas cuantificadas en los tejidos de la raíz puedan, al menos en parte, estar siendo secretadas para solubilizar fósforo en la rizósfera, decidimos cuantificar la actividad de las enzimas fosfatasa en la solución nutritiva. En este ensayo pudimos observar un incremento de la actividad enzimática extracelular en condiciones de déficit de P y agregado de NO exógeno en plantas con 21 días de déficit nutricional (Figura 4.14).

La secreción de enzimas fosfatasa al medio extracelular se incrementa en condiciones de déficit de P (Tran y Plaxton, 2008), y los resultados obtenidos en este trabajo de tesis indicarían que dichas enzimas se incrementan aún más en presencia de NO exógeno. Son necesarios futuros análisis a fin de conocer si en estas condiciones experimentales el aparente aumento de la

actividad enzimática generado a partir del agregado de NO en el medio de cultivo es causado por el efecto del mismo sobre la síntesis, la actividad, o el transporte de las enzimas.

Dado que las enzimas fosfatasa tienen funciones relacionadas no sólo con mejorar la eficiencia de adquisición del fósforo PAE, (*phosphorus acquisition efficiency*), sino que también participan del reciclado de P interno, se observa que las plantas sometidas a déficit de P ven incrementada su actividad fosfatasa en tejidos aéreos (Veljanovski y col., 2006), y este incremento de la actividad es rápidamente suprimido al reestablecer la dotación de P (Bozzo y col., 2004). Al cuantificar la actividad de las enzimas fosfatasa en las distintas hojas observamos una diferencia significativa de la actividad enzimática en las hojas más viejas en las que se pudo medir (3 y 4) entre los tratamientos con suficiencia y déficit de P, pero no hay diferencias significativas atribuibles a efectos generados por la exposición al GSNO como dador exógeno de NO (Figura 4.15), permitiendo asumir que el efecto modulador del NO sobre las fosfatasa se comporta de manera diferencial en el vástago y en la raíz, donde como ya se mencionó, sí se observan diferencias significativas. Esto conduce a plantear dos alternativas, una debida a la no translocación del efecto del NO suministrado en la solución nutritiva hacia la parte aérea de la planta, lo que contrasta con los efectos observados en la mantención de los niveles de clorofila y una segunda posibilidad relacionada con el hecho de que existe una gran variedad de proteínas con actividad de fosfatasa ácida. Se han descrito 35 genes para fosfatasa ácidas en el genoma de soja, que corresponden a proteínas con especificidad de tejidos, órganos y distribución subcelular, asimismo existen diferencias en cuanto a la respuesta frente a la deficiencia de P (Li y col., 2012). Por lo tanto es posible que diferentes proteínas pertenecientes al grupo de fosfatasa ácidas resulten afectadas en forma diferencial por la presencia de NO.

#### 5.1.5 Efecto de la adición de GSNO sobre el pH rizosférico

La acidificación de la rizosfera a partir de la extrusión de protones y/o ácidos orgánicos es una respuesta al déficit de P (Baker y col., 2015; Li y col., 2012; Shen y col, 2006; 2011; Yan y col., 2002). La disminución del pH facilita la solubilización de P precipitado en el suelo y mejora las posibilidades de captación del mismo por parte de las raíces.

Las plantas de maíz expuestas durante 6 días a restricción de P, generaron una fuerte caída en el pH de la solución nutritiva, mostrando diferencias significativas respecto a las plantas provenientes de condiciones de suficiencia de P. La habilidad para acidificar el medio, a su vez, fue incrementada en presencia del dador de NO (Figura 16 A y B), de forma significativa para las plantas en condición de déficit de P.

Se plantea que el fenómeno de acidificación del medio rizosférico podría estar relacionado con mecanismos específicos dependientes del NO que incrementan la extrusión de protones y/o ácidos orgánicos. Esto es debido a que se ha descrito que el NO estimula la expresión y la actividad de la  $H^+$ -ATPasa ubicada en la membrana plasmática cuando las plantas enfrentan situaciones de estrés, y también que la reducción de la concentración del NO en los tejidos inhibe esta actividad enzimática (Zhao et al., 2004). Este mismo efecto fue posteriormente confirmado en plantas de maíz, donde un dador de NO, SNP (*sodium nitroprusside*), incrementó la actividad de las bombas  $H^+$ -ATPasa en la membrana celular (Zandonadi y col., 2010). Un efecto análogo, de aumento de la actividad  $H^+$ -ATPasa inducido por el déficit de P y la exposición al NO podría estar siendo una de las causas de la acidificación del medio rizosférico observada durante los experimentos. A fin de comprobar esta hipótesis serán necesarios estudios que nos permitan profundizar en el rol del NO sobre la actividad  $H^+$ -ATPasa de la membrana plasmática como respuesta al déficit de P.

Sin embargo, la acidificación del medio rizosférico, puede tener su origen en fenómenos distintos a la extrusión de protones, como es el exudado de ácidos orgánicos, el cual se incrementa por parte de las raíces en condición de déficit de P (Hinsinger 2001). Para este mecanismo de aclimatación se han descrito notables variaciones entre especies (Neumann y Römheld, 1999), encontrándose para el caso del maíz una correlación entre la tolerancia al déficit de P en diferentes variedades y la capacidad para exudar ácidos orgánicos (Gaume y col., 2001).

El suelo es una matriz compleja, donde los ácidos orgánicos interactúan a diferentes niveles y no solo afectan al pH, sino que los iones orgánicos también compiten con el P por los sitios de adsorción de la matriz coloidal del suelo (Lopez-Hernandez y Siegert, 1986) y son capaces de reaccionar con el hierro y el aluminio presentes en el suelo y evitar que estos últimos precipiten el P en forma de sales de baja solubilidad (Hocking 2001). Los ácidos orgánicos, por lo tanto, representan un recurso muy potente a la hora de modular la disponibilidad del P en el suelo. En el marco de esta tesis intentamos llevar adelante cuantificaciones de malato y citrato exudados hacia



la solución nutritiva mediante técnicas de HPLC, sin embargo los niveles resultaron por debajo del límite de detección de nuestros equipos en estas condiciones experimentales, no permitiendo descartar la posibilidad que, al menos en parte, la extrusión de ácidos orgánicos pueda estar contribuyendo a los cambios observados en el pH. En un futuro sería deseable poder utilizar un sistema de cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de masas para replicar la técnica mediante la cual Wang y col. (2015), demostraron el incremento de los exudados de ácidos orgánicos en condiciones de déficit de P, lo cual nos permitirá establecer si el NO participa también en la modulación de dicho proceso.

#### **5.1.6 Efecto de la adición de GSNO sobre la capacidad de captación de P por las raíces**

En la interacción de la planta con el suelo, a la hora de tener en cuenta la disponibilidad de nutrientes, no sólo es importante evaluar la concentración de los mismos en el suelo y las estrategias que la planta pueda desarrollar para incrementar su solubilidad y su reciclaje interno, sino que también es importante considerar las características propias de la planta que permiten incrementar la absorción del nutriente frente a similares condiciones de disponibilidad, ya que el estatus nutricional alcanzado por la planta también es resultado de la dinámica de la interacción planta-suelo. En este sentido, la capacidad de absorción neta de P es una característica importante de la raíz que ha demostrado mantener una estrecha correlación con el nivel nutricional alcanzado (Cogliatti y Santa-Maria, 1990; Raghothama y Karthikeyan, 2005). En este sentido, ha sido bien establecido tanto para maíz como para otras plantas, que la capacidad de la raíz para absorber P se incrementa en condiciones de déficit nutricional, pudiendo cuantificarse en función de la velocidad de absorción del nutriente en el momento en el cual el suministro es re-establecido (Cogliatti y Clarkson, 1983; Lee y col., 1990; Schachtman y col., 1998). En la regulación de los procesos de absorción participan mecanismos tanto transcripcionales como post-transcripcionales sobre sistemas específicos de transporte (Gu y col., 2016; Yue y col., 2017).

En nuestras condiciones experimentales, se evidenció un incremento de la capacidad de absorción de P a partir de una solución diluida para plantas que provenían de una solución deficiente en P, comparado con plantas que crecieron en suficiencia de P. El dador de NO generó un incremento aún mayor sobre la capacidad de incorporación de P desde el medio externo en las plantas sólo

cuando las mismas provenían de una situación de déficit del mismo (Figura 4.17). El incremento en la capacidad de absorción se evidenció como una respuesta temprana al déficit, existiendo diferencias claramente significativas a los 6 días de tratamiento. Si bien hay que considerar que lo observado es el resultado neto, producto del balance entre el influjo y el eflujo de P, el resultado obtenido debería ser atribuido principalmente a cambios en el influjo de P, ya que por estar sometidas a un déficit severo, el eflujo de P desde la planta a través de las raíces es despreciable (Cogliatti y Santa-Maria, 1990).

Ha sido demostrado hace tiempo en plantas de maíz que la participación de los mecanismos de transporte de alta afinidad que median el ingreso de P desde medios de baja concentración, es incrementada bajo condiciones de deficiencia de P (Lee y col., 1990), lo que podría ser atribuido a un incremento de la actividad de los transportadores de alta afinidad (Calderon-Vazquez y col., 2011). Además, a fin de mantener la homeostasis de P, bajo condiciones de suficiencia del mismo, los transportadores de P son degradados en procesos mediados por ubiquitinación, los cuales resultan inhibidos bajo condiciones de déficit de P, incrementando la capacidad de absorción y la translocación raíz-vástago (Wang y col., 2017; Yue y col., 2017). Resulta interesante el hecho de que entre los mecanismos regulados por el NO hayan sido descriptos procesos en los cuales participa en la señalización para la degradación de proteínas por ubiquitinación (Arnaud y col., 2006; Peng y col., 2008). A su vez, bajo condiciones de deficiencia de P, se ha observado un incremento en la presencia de NO endógeno y un aumento en la expresión de los genes que codifican para transportadores de P en raíces de arroz, facilitando la translocación de P hacia el vástago (Zhu y col., 2016).

Si bien se ha podido evidenciar una respuesta interesante no descripta anteriormente para el NO en relación con el incremento de la capacidad de absorción de P a partir de soluciones diluidas en plantas sometidas restricción del mismo, aún queda mucho por investigar en torno a los mecanismos moleculares que relacionan el NO con esta respuesta en particular en relación con los posibles transportadores de P en el maíz involucrados en estos procesos.

Al observar de forma integral los efectos del NO sobre las respuestas a la deficiencia de P en las plantas de maíz, se abren nuevos interrogantes. Por un lado el NO incrementa la capacidad de absorción de P desde soluciones diluidas, y genera una mejora en la capacidad de elaboración de otras respuestas típicas de aclimatación al déficit de P, como son la actividad de enzimas fosfatasa y la acidificación del medio rizosférico. Estas últimas tendientes a incrementar la

biodisponibilidad de P. En conjunto estos efectos sugieren que las plantas que transitan una situación de restricción de P en presencia de niveles elevados de NO presentan una mayor capacidad de absorción de P. Por otro lado el tratamiento con NO redujo la EPU en las plantas expuestas a déficit de NO. En este sentido, los resultados muestran que para el maíz, en las condiciones utilizadas en este trabajo, donde se anuló el componente de absorción de P, colocando las plantas en solución nutritiva sin P, con el objetivo de analizar el efecto del dador de NO sobre la utilización del nutriente sin que resulte enmascarado por diferencias en el componente de adquisición del nutriente, la presencia del dador de NO produce una disminución en la mayoría de indicadores de eficiencia utilizados, fundamentalmente los dinámicos.

En un escenario de posibles restricciones en el acceso a fertilizantes fosforados es necesario desarrollar mecanismos que permitan contar con cultivos que presenten un incremento en la eficiencia de uso de P. La eficiencia de uso de P puede ser separada en dos componentes: la eficiencia de adquisición y la eficiencia interna de utilización (Veneklaas y col., 2012). Mejorando la eficiencia de adquisición es posible incrementar la captura de P desde la solución del suelo, mientras que la eficiencia interna de utilización representa la capacidad de generar biomasa por unidad de P adquirido por las plantas (Rose y col., 2011; Santa-María y Moriconi, 2015). La eficiencia interna de utilización resulta compleja de evaluar y recientemente se han desarrollado procedimientos que pueden resultar adecuados (Rose y col., 2016; Santa-María y Moriconi, 2015). Si bien la red de señalización que lleva a controlar los mecanismos que confieren a los cultivos una mejora en la eficiencia de utilización de P no se conoce en detalle, las diferencias en este carácter o *trait* parecen estar relacionadas con diferencias en la removilización o re-localización del P (producto del reemplazo de fosfolípidos por sulfolípidos o galactolípidos, degradación del ARN, y modificación en los transportadores) lo que permite economizar este nutriente.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren una mejora en la capacidad de absorción de P como consecuencia de la exposición a NO, mientras que por otro lado el tratamiento con NO redujo la EPU en las mismas plantas expuestas a déficit de P. Para profundizar más en esta relación entre la EPU y la capacidad de absorción y solubilización de P, resultaría interesante llevar adelante experimentos con deficiencias moderadas de P para determinar si la habilidad de absorción de P modificada por el NO puede plasmarse en una mayor disponibilidad de P dentro de la planta, y si esta impacta en la EPU. Existen trabajos que profundizaron sobre la relación entre las eficiencias de uso y absorción del P (Rose y col., 2011), por lo cual la caracterización del rol que

el NO puede desempeñar en la interacción de ambas resulta interesante para la continuidad de los resultados presentados en esta Tesis.

## **5.2 Deficiencia de P en plantas de soja. Efectos tempranos sobre el proteoma y el metabolismo de óxido nítrico**

### **5.2.1 La restricción de P genera cambios tempranos en el proteoma sin afectar otros procesos fisiológicos**

La electroforesis es una técnica de separación de alta resolución, frecuentemente utilizada para el fraccionamiento de mezclas de proteínas, previo a la identificación de las proteínas por espectrometría de masas. La técnica tradicional de 2D-PAGE ha sido el método primario para los estudios de proteómica cuantitativa utilizado para estudiar las respuestas en numerosas especies expuestas a situaciones de estrés ambiental (Lv y col., 2016; Zhang y col., 2014). Sin embargo esta técnica presenta algunas limitaciones, como la baja representación de proteínas con alto peso molecular y punto isoelectrico; de proteínas de membranas, debido a su pobre solubilidad; y de proteínas de baja abundancia (Mirzaei y col., 2012). Una estrategia alternativa denominada “*shotgun proteomics*”, reduce la necesidad del fraccionamiento de las proteínas y emplea la digestión de una mezcla de proteínas para producir una colección de péptidos que son analizados por espectrometría de masas *on-line*, dando lugar a un mayor número de aciertos proteicos que cubren una mayor proporción de los proteomas teóricos. Este hecho permite una comparación más confiable entre los conjuntos de datos de proteínas. Por esto, hoy en día el análisis de proteómica por espectrometría de masas *shotgun* se utiliza para identificar cambios en proteínas en diferentes condiciones biológicas (por ejemplo, localización, abundancia relativa, complejos proteicos y modificaciones postraduccionales)(Liu y col., 2004).

Sha y col., (2016) utilizando electroforesis 2-D y espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF llevaron adelante un análisis proteómico comparativo utilizando el cultivar de soja BX10 de alta capacidad de adquisición de P en condiciones de bajo y elevado suministro de P. Veintitrés proteínas fueron acumuladas diferencialmente luego de 3 ó 6 días de deficiencia de P. Estas proteínas estaban principalmente involucradas en el metabolismo energético, como son las proteínas pertenecientes al ciclo de Calvin y la vía de las pentosas fosfato. En este trabajo de tesis, empleando una

estrategia de análisis de proteómica por *shotgun*, se observó un total de 202 proteínas diferencialmente expresadas y 232 proteínas incrementadas en hojas de soja (Williams 82) luego de 24h de restricción de P. Este análisis proteómico fue llevado delante de manera conjunta con la evaluación de otros procesos fisiológicos, como el desempeño fotosintético, la concentración de P, y niveles de NO y ROS. Bajo estas condiciones experimentales, la concentración total de P decreció un 27% en las hojas unifoliadas luego de 24 h de restricción de P. Aunque ni los parámetros fotosintéticos ni el crecimiento fueron significativamente afectados, el análisis del proteoma y las modificaciones en los niveles de NO sugieren que existen cambios metabólicos tempranos inducidos durante las primeras horas de déficit de P.

Trabajos previos indican que numerosas proteínas se incrementan en las hojas de maíz bajo exposiciones prolongadas a estrés por déficit de P, entre estas proteínas, se encuentran las involucradas en la vía de las pentosas fosfato, la glucólisis y la vía de los ácidos tricarboxílicos (relacionadas al metabolismo energético), proteínas de unión al ARN, chaperonas (como la HSP70), enzimas antioxidantes (como ascorbato peroxidasa y glutatión S-transferasa) y enzimas involucradas en la síntesis de etileno (Zhang y col., 2014). Por otro lado, las proteínas disminuidas en condiciones de restricción de P aparecen principalmente relacionadas con la fotosíntesis. Hermans y col., (2006), ha elaborado una revisión sobre el efecto que ejercen las deficiencias minerales sobre la expresión de genes involucrados en el metabolismo primario. En el caso específico de la deficiencia de P se describe una reducción en la expresión de genes y el nivel de proteínas involucrados en la fotosíntesis, como son los genes que codifican para diferentes subunidades de los fotosistemas (pertenecientes a la categoría *GO* de fotosíntesis). Mientras tanto, genes codificando enzimas pertenecientes a la categoría *GO* del metabolismo de carbohidratos como la sacarosa sintasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa and UDP-glucosa pirofosforilasa fueron incrementados en vástagos de plantas deficientes en P. Los resultados presentados en esta tesis (Figura 4.22, tabla 4.6) muestran cambios en proteínas del metabolismo al comienzo de la restricción de P, cuando los niveles de P comienzan a decaer en los tejidos. Un cambio evidente en proteínas principalmente relacionadas con la fotosíntesis sugiere que los procesos involucrados en el metabolismo del carbono son afectados en las hojas expuestas a restricción de P en etapas tempranas (Figura 4.24). Adicionalmente el incremento de enzima ácido delta-aminolevulínico deshidratasa, involucrada en la síntesis de los grupos hemo y la clorofila en las hojas -P podría indicar la activación de mecanismos compensatorios.

El decaimiento en el contenido de P inorgánico en el citoplasma bajo condiciones de estrés severo, la reducción de los niveles de ATP, ADP y otros nucleótidos relacionados que contienen P, pueden inhibir el flujo de carbono a través de las enzimas del proceso de glucólisis. Sin embargo, las plantas tienen que mantener un flujo de C para el proceso de respiración en función de obtener energía y estructuras carbonadas necesarias para los procesos anabólicos. En este sentido, enzimas que desvían algunos pasos de la glucólisis (*glycolytic bypass enzymes*) han sido descritas como reguladas positivamente en plantas en condiciones de déficit de P, revisado por Plaxton y Tran (2011). Varias de estas enzimas utilizan pirofosfato inorgánico (PPi) para desarrollar el trabajo en la célula preservando ATP y reciclando P. Bajo las condiciones experimentales utilizadas aquí, en hojas de soja la subunidad alfa de la pirofosfato-fructuosa 6-fosfato 1-fosfotransferasa (6-fosfofructuokinasa, dependiente del pirofosfato) fue diferencialmente expresada bajo restricción de P. Esta enzima cataliza la interconversión reversible entre la fructuosa-6-fosfato y la fructuosa-1,6-bifosfato (Duan y col., 2016) y puede participar en procesos metabólicos alternativos de la glucólisis en el citosol. Otras enzimas que participan en glucólisis alternativa en el citosol y procesos alternativos en la mitocondria fueron también incrementados bajo restricción temprana de P, como la sacarosa-fosfato sintasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, PEP carboxilasa, malato deshidrogenasa y enzima málica, sugiriendo que el metabolismo se está preparando para enfrentar restricciones más severas en la disponibilidad de P.

También resulta interesante que la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, enzima de la vía de las pentosas fosfato y la glicolato oxidasa, enzima del metabolismo fotorrespiratorio fueron incrementadas bajo condiciones de restricción de P en las hojas de soja, fortaleciendo la hipótesis que cuando las concentraciones de P en la hoja son moderadas, la fotorrespiración libera Pi estromal mejorando la fotofosforilación y la regeneración de RuBisCO, sustentando así la asimilación de C (Ellsworth y col., 2015).

En relación a otras enzimas del metabolismo de carbohidratos, una alfa-1,4-glucano fosforilasa se vio incrementada bajo condiciones de déficit de P. Esta enzima es ampliamente conocida por su contribución a la degradación fosforolítica del almidón. Sin embargo, ha sido descrito que la  $\alpha$ -glucano fosforilasa plastídica no resultó necesaria para la degradación de almidón en hojas de *Arabidopsis* pero parece actuar dando una respuesta rápida a cambios ambientales súbitos que den lugar a situaciones de estrés abiótico (Zeeman y col., 2004). El rol de las fosforilasas puede ser proveer hexosas fosfato como sustratos para la vía oxidativa de las pentosas fosfato durante la noche. Esta vía utiliza glucosa-6-P para abastecer NADPH a muchas reacciones biosintéticas, pero

también es importante para el control de los niveles de ROS a través del ciclo del ascorbato-glutación (Zeeman y col., 2004). Es posible que una compleja red de reacciones siguientes a las primeras horas de privación de P incluya proteínas relacionadas a la modulación de los niveles de ROS, haciendo posible que mecanismos de señalización ocurran. Bajo las condiciones experimentales utilizadas en esta tesis, la generación de ROS detectada empleando microscopía de fluorescencia en presencia de DCFH, fue principalmente localizada en uno de los sitios centrales descritos para la generación de ROS en células de plantas, el cloroplasto, y los niveles parecen ser controlados hasta las 48 h de restricción de P. Por lo tanto, la presencia de proteínas con actividad peroxidasa, ascorbato peroxidasa y glutación reductasa en las hojas, puede ser una clave para controlar el balance redox en la célula (Foyer y Noctor, 2005).

Genes involucrados en el metabolismo secundario son diferencialmente regulados en las plantas deficientes en P, como por ejemplo los genes relacionados con la síntesis de antocianinas (Hammond y col., 2004). En hojas restringidas en P se evidenció la presencia de proteínas asociadas al metabolismo de flavonoides, pertenecientes a las familias de las chalcona y estilbeno sintasas, y chalcona isomerasas, centrales en el metabolismo de flavonoides, y otras glicosil transferasas (pertenecientes a la familia UDP-glicosil transferasas) asignadas a la función molecular GO de actividad quercetin glicosil transferasa. En este sentido, la oxidación de flavonoides parece tener un rol en la protección de las plantas durante el desarrollo y el crecimiento, y contra estreses bióticos y abióticos (Pourcel y col., 2007). La presencia de flavonoides podría ser parte de mecanismos para responder al estrés oxidativo ya que los flavonoides podrían actuar como antioxidantes (Agati y col., 2012).

### **5.2.2 Cambios tempranos en los niveles de NO y la actividad nitrato reductasa**

Wang y col., (2010) describieron una relación entre la generación de NO y la deficiencia de P en lupino blanco, donde la deficiencia de P indujo un incremento en la concentración endógena de NO en las raíces primarias y laterales. Resulta interesante que la formación de raíces tipo *cluster*, una respuesta típica de las plantas de lupino al déficit de P, fue regulada por el NO (Meng y col., 2012). Además, experimentos desarrollados en este trabajo de tesis también demostraron que algunas repuestas típicas de aclimatación claves al déficit de P en plantas de maíz fueron influenciadas por NO exógeno (Sección 4.1).

La privación de P llevó a un incremento en la detección de NO en raíces de *Arabidopsis thaliana wild type*, mientras que el mismo tratamiento no generó incremento en la detección de NO en la doble mutante *nia1,2* (Royo y col., 2015). Los niveles más bajos de NO exhibidos por las mutantes *nia* creciendo en un medio de cultivo carente de P, sugieren la importancia de la vía de la NR para la producción de NO bajo condiciones de déficit de P (Royo y col., 2015). Es importante mencionar que trabajos previos se han focalizado principalmente en el efecto de los niveles de NO en raíces, y aquí en este trabajo de tesis hemos centrado el estudio también en la parte aérea, en las hojas, donde ha sido observado que el NO se incrementa bajo condiciones de déficit de P.

Experimentos de largo plazo demostraron que el metabolismo del nitrógeno puede ser afectado bajo condiciones de restricción de P en varios sentidos: la captación de  $\text{NO}_3^-$  en las raíces disminuye (así como la translocación del  $\text{NO}_3^-$  de las raíces al vástago), y cantidades crecientes de aminoácidos, principalmente arginina, se incrementan en las hojas de soja (Rufy y col., 1993). Bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, la actividad NR como los niveles de NO se vieron incrementados en condiciones de restricción de P. Adicionalmente, una isoforma de la NR fue exclusivamente expresada en las hojas de plantas sometidas a restricción de P. En concordancia con estas observaciones, la actividad NR también se vio incrementada en hojas de un cultivar de citrus sometidas a déficit de P (Rabe y Lovatt, 1986). La concentración de P citosólico podría ser uno de los factores involucrados en este control, ya que la actividad de la NR es controlada por fosforilación, que ha demostrado ser un mecanismo efectivo de inactivación de la enzima *in vivo* (Huber y col., 1992). Esto nos conduce a la idea de que los niveles de NO pueden ser consecuencia del incremento de la actividad NR inducida por la disminución de la concentración de P en las hojas. Sin embargo, así como fue descripto que no solo la actividad NR, sino también el nitrito (Royo y col., 2015), los niveles de amonio y la biosíntesis de arginina *de novo* fueron incrementados bajo condiciones de deficiencia de P (Rabe y Lobatt, 1986; Rufy et al., 1993), otras posible fuentes de generación de esta especie (que involucren arginina y poliaminas, u otras formas de reducir el nitrito) no pueden ser descartadas, y pueden contribuir también a la síntesis de NO en las hojas de soja bajo condiciones de restricción de P.

El etileno participa de la modulación de respuestas bajo condiciones de restricción de P (Lei y col., 2011; Zhu y col., 2016), también en combinación con NO (Zhu y col., 2017). En hojas de soja creciendo bajo restricción de P, se evidenció la presencia de la enzima metiltioribulosa-1-fosfato deshidratasa, involucrada en una ruta alternativa en la biosíntesis de la L-metionina (*salvage pathway*). Esta vía es un mecanismo metabólico que recicla el azufre reducido en  $\text{S}^2-$



metiltioadenosina (MTA) recuperando el azufre reducido en la metionina (Ashida y col., 2008). Este mecanismo de reciclado de la metionina juega un rol importante en sustentar la producción continua de etileno y poliaminas (Miyazaki y Yang, 1987). Adicionalmente, la enzima que participa en la síntesis del precursor del etileno (s-adenosyl-L-methionina, SAM) S-adenosilmetionina sintasa, también se vio incrementada bajo restricción de P en las hojas. Ya fue descrito que el etileno actúa aguas arriba del NO en plantas de arroz deficientes en P. El incremento de los niveles de NO fue observado tempranamente (3h) luego de colocar a las plantas en una solución completamente carente de P (Zhu y col., 2017). En nuestras condiciones experimentales, los niveles de NO se incrementaron paralelamente a la actividad NR en las hojas de plantas de soja sometidas a restricción de P. Así, la presencia de proteínas involucradas en la síntesis de etileno sugieren una posible interacción entre el NO y el metabolismo del etileno en hojas de soja pasadas las primeras 24 h de restricción de P, de la misma forma que fue descrito para las plantas de arroz en condiciones de deficiencia de P (Zhu y col., 2017).

### 5.2.3 Nitración de proteínas en hojas de soja durante las primeras horas de restricción de P

La nitración de grupos aromáticos incluye la adición de un grupo nitro (NO<sub>2</sub>) en los residuos tirosina (Y), pudiendo interferir en la funcionalidad de la proteína. En las plantas, la nitración específica de proteínas no ha sido estudiada tan extensivamente como lo ha sido la s-nitrosilación (Simontacchi y col., 2015). Sin embargo, blancos putativos para la nitración de tirosinas han sido identificados en hipocotilos de girasol (Chaki y Valderrama, 2009), en plántulas de *Arabidopsis* en condiciones controles, sin estrés (Lozano-Juste y Colom-Moreno, 2011) y luego de la respuesta hipersensitiva (Cecconi y col., 2009), y también en plantas de citrus expuestas a estrés por salinidad (Tanou y col., 2012). Bajo las condiciones experimentales utilizadas en esta tesis, identificamos proteínas nitradas en hojas de soja empleando la técnica de *shotgun* para análisis de proteómica, una metodología que permitió detectar sitios de nitración en proteínas propuestas como blancos putativos de la nitración en trabajos previos en los cuales emplearon 2D-WB. Como puede observarse en la Figura 4. 27, las proteínas relacionadas a la fotosíntesis y al ciclo de Calvin fueron los principales grupos de proteínas modificados. Aunque los niveles de NO se vieron incrementados bajo condiciones de restricción de P, el patrón de nitración de las proteínas no fue sustancialmente modificado en las hojas, sugiriendo que esta modificación es un proceso

específico y cuidadosamente regulado. En este sentido, la búsqueda de proteínas putativamente nitradas en hojas de *Arabidopsis thaliana* previamente tratadas con peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) llevó a la identificación de un número limitado de proteínas (ocho diferentes proteínas) relacionadas con la fotosíntesis, la síntesis de ATP, el ciclo de Calvin, la glucólisis, y la asimilación de nitratos, y esas mismas proteínas también resultaron nitradas luego de la respuesta hipersensitiva (Cecconi y col., 2009). En concordancia con el trabajo de Lozano Juste (2011), la mayoría de las proteínas nitradas en las hojas de soja tienen localización cloroplástica, que a su vez es un sitio propuesto para la síntesis de NO y producción de anión superóxido (Asada, 2006; Galatro y col., 2013; Gas y col., 2009; Jasid y col., 2006). La nitración de proteínas es mediada por especies reactivas del nitrógeno tales como  $\text{ONOO}^-$  y dióxido de nitrógeno ( $\bullet\text{NO}_2$ ), formados como productos secundarios del metabolismo del NO en presencia de oxidantes como el radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), y metales de transición (Radi 2004). El rendimiento del proceso de nitración biológica es bajo debido a la multiplicidad de procesos; incluyendo las velocidades de reacción y difusión que los precursores de las especies nitrantes y los intermediarios de la nitración pueden sufrir, y los mecanismos de reparación de los radicales tirosilo como la reducción por parte del glutatión y, presumiblemente, por el metabolismo de la 3-nitrotirosina (Radi, 2004). Durante las primeras horas de restricción de P en las hojas de soja solamente una proteína fue diferencialmente nitrada, la metionina sintasa. En ensayos *in vitro*, desarrollados con una metionina sintasa recombinante se evidenció un posible sitio para la nitración de un residuo tirosina (Lozano Juste y col., 2011). Este sitio de nitración (YLFAGVVDGR) Y287, altamente conservado en otras plantas incluida la soja, difiere en nuestros resultados (YLLLSKPAK) Y161, probablemente debido a que la nitración *in vivo* podría ocurrir de manera distinta. Adicionalmente, la metionina sintasa purificada de hígado de rata resultó irreversiblemente inactivada en presencia de NO gas (Nicolaou y col., 1996). Sin embargo, el significado funcional de esta modificación de las proteínas *in planta* requerirá estudios más profundos.

### **5.3 Deficiencia de P en plantas de maíz y soja. Análisis comparativo de las respuestas tempranas a la restricción de P**

Las plantas de soja y maíz presentan diferencias sustanciales en su metabolismo energético, las diferencias en la forma y lugar donde se desarrolla la fotosíntesis en ambas especies permite

clasificarlas en grupos diferentes, cada uno con un metabolismo energético característico y una morfología asociada al mismo.

La soja presenta un metabolismo denominado carbono 3 (C3) que se caracteriza por completar todo el proceso fotosintético en un sólo tipo celular, principalmente las que componen el mesófilo de las hojas, y donde la enzima RuBisCO participa de dos ciclos: el de Calvin-Benson y el de la fotorrespiración.

Por su parte, el maíz posee un metabolismo denominado carbono 4 (C4). Este presenta una diferenciación celular en los tejidos de la hoja que separa espacial y temporalmente en dos etapas el proceso de la fotosíntesis, el cual queda dividido entre las células del mesófilo, donde se captura el CO<sub>2</sub> y las de la vaina, donde se libera para generar un ambiente enriquecido en CO<sub>2</sub> que permite mejorar la eficiencia de la enzima RuBisCO favoreciendo la actividad carboxilasa, en relación a la actividad oxidasa, que naturalmente se ve incrementada en condiciones de elevada temperatura e irradiancia. Esto conlleva diferencias en los cloroplastos de ambos tipos celulares. Las membranas tilacoidales de las células del mesófilo contienen todos los componentes de la cadena de transporte de electrones, de forma similar a las plantas C3. Por el contrario, los tilacoides de la vaina contienen pocos componentes del fotosistema II, con niveles normales de fotosistema I, por lo cual principalmente realizan un transporte cíclico de electrones.

Dado que el P forma parte de los azúcares fosfato y los nucleótidos, es de esperar un impacto sobre el proceso de fotosíntesis frente a una disminución del P inorgánico intracelular. Además según el tipo de metabolismo (C3 o C4) se pueden esperar variaciones en la respuesta de las plantas frente al déficit nutricional de P.

### **5.3.1 Los cambios en el contenido de P no afectan los parámetros fotosintéticos y fisiológicos durante las primeras horas de restricción**

Las plantas de maíz y soja sometidas a déficit de P en el medio de cultivo presentan un decaimiento en la concentración de P en los tejidos de la hoja (hoja unifoliada en plantas de soja, hoja 2 en plantas de maíz), que a las 24 h de tratamiento ya resulta significativo y similar en ambas especies (Figura 4.29). Este decaimiento en la concentración de P a tiempos cortos de restricción, no impacta sobre los parámetros fotosintéticos evaluados en esta tesis, ya que ni el contenido de clorofila estimado indirectamente mediante la técnica de SPAD, ni el  $\phi$ PSII mostraron diferencias significativas entre las plantas en condición de suficiencia y las plantas restringidas en P (Figura

4.31). El intercambio de gases, evaluado mediante el uso de un porómetro, tampoco arrojó diferencias significativas (Figura 4.32). Es decir, que si bien la concentración de P disminuyó significativamente en las hojas, algunos parámetros fisiológicos a las 24h aún permanecieron estables para ambas especies. Es un hecho conocido que la restricción de P, a tiempos más prolongados, genera una reducción de la tasa fotosintética, el contenido de clorofila y que afecta la relación sacarosa/almidón en las hojas en diferentes especies (Foyer y Spencer, 1989). La ausencia de un impacto de la caída del P en los tejidos sobre las funciones fotosintéticas en los experimentos desarrollados en el marco de esta tesis puede deberse al hecho que el decaimiento en la concentración de P medido en el experimento es en la hoja completa, y puede estar reflejando la caída de la concentración en la vacuola, mientras los valores citoplasmáticos se mantienen en un rango fisiológico para garantizar el normal funcionamiento del aparato fotosintético. En algunos tejidos, hasta 10 días después del inicio de la exposición al déficit, las reservas vacuolares se reducen drásticamente mientras que los niveles de P en el citoplasma se mantienen sin cambios significativos (Lee y col., 1990).

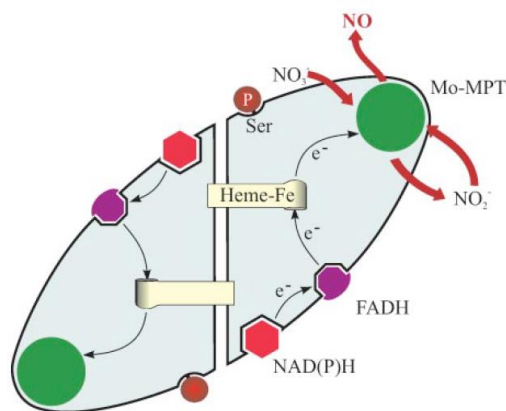
### **5.3.2 Cambios en los niveles de NO frente a la deficiencia de P**

Si bien no se observaron cambios fisiológicos a nivel macroscópico en las plantas durante las primeras 24 h de déficit de P, si se observaron cambios en los niveles de NO en las hojas afectadas por la restricción de P. Ese cambio, resultó distinto para ambas especies, ya que las hojas unifoliadas de soja (C3), incrementaron significativamente el nivel de NO, mientras que las hojas del maíz (C4) no, con una tendencia a disminuir el nivel de esta molécula. Además resulta sumamente interesante la distribución del NO, ya que en maíz la reducción en la fluorescencia correspondiente a la detección de NO se observó principalmente en las células de la vaina, donde el decaimiento en la presencia de NO fue visiblemente mayor que en la zona de las células del mesófilo (Figura 4.34). Es interesante mencionar que las diferencias observadas para las plantas de maíz y soja en relación al contenido de NO, coincidieron con los cambios observados en la actividad de la enzima NR, que también incrementó significativamente su actividad en las hojas de soja restringidas en P y disminuyó significativamente su actividad en las plantas de maíz restringidas en P (Figura 4.35).

La enzima NR presente en todas las plantas superiores, tiene como principal función la asimilación del nitrógeno a partir de nitratos absorbidos del medio. La reducción del nitrato a nitrito mediada por la NR implica la adición de dos electrones obtenidos a partir del NADH o el NADPH (Hoff y col., 1992). El nitrito es posteriormente reducido a amonio por actividad de la enzima nitrito reductasa (NiR) dependiente de la ferredoxina reducida, e incorporado a las estructuras aminoacídicas. La enzima NR es una flavoproteína compleja compuesta por homodímeros que a su vez alojan tres grupos prostéticos, FAD, un grupo hemo y un cofactor de molibdeno-cobre, y que se encuentra principalmente en forma soluble en el citosol, aunque hay reportes de análogos unidos a la membrana plasmática (Stöhr y Ullrich, 1997).

Desde comienzos de los años 90, se conoce que la actividad de la enzima NR es inhibida en pocos minutos en condiciones que también inhiben la fotosíntesis, como la oscuridad o la elevada concentración de  $\text{CO}_2$  (Kaiser y Brendle-Behnisch, 1991). La regulación de la actividad NR acoplada a la fotosíntesis, tendría como función impedir una acumulación tóxica de nitrito, cuya reducción a amonio, como se mencionó previamente, es dependiente de la ferredoxina reducida generada durante la fase lumínica de la fotosíntesis (Lea y col., 2004).

Para plantas de maíz de edad similar a las utilizadas en estos ensayos, se observó la existencia de una sincronía entre la actividad de NR en las hojas y los ciclos de luz/oscuridad, siendo el pico de máxima actividad entre las 4 y 8 h luego de iniciado el fotoperíodo (Bowsher y col., 1991), momento coincidente con el de la realización de las mediciones presentadas en este capítulo. En plantas C3 como la espinaca, también se observa un incremento de la actividad de la enzima NR durante las primeras horas del día, y se determinó que el mismo no está asociado a una mayor síntesis de NR, sino a una regulación de la actividad por modificaciones postraduccionales (Huber y col., 1992). Durante la noche la enzima se fosforila, inhibiendo así su actividad, mientras que durante el día la enzima se desfosforila y la actividad se recupera (Huber y col., 1994). La inhibición de la actividad NR se produce por la fosforilación de un residuo serina altamente conservado (Lillo y col., 2003). La inhibición mediada por la fosforilación se produce a causa de un cambio conformacional que la fosforilación induce en la enzima; la fosforilación inhibitoria se da en el sitio de la enzima donde el grupo hemo-Fe se une al dominio Mo-Mpt (molibdeno-molibdopterina) y habilita a la unión en este punto de un tipo de proteínas, denominado 14-3-3, que en presencia de cationes divalentes como el  $\text{Mg}^{++}$  genera un cambio conformacional que inhibe la actividad enzimática (Lillo y col., 2004). Esta inhibición es revertida por actividad de la enzima fosfatasa PP2A (MacKintosh y Meek, 2001).



## NR

**Figura 5.1.** Esquema estructural y funcional de la NR. El dominio FAD (Flavina adenina dinucleótido) acepta dos electrones ( $e^-$ ) del NAD(P)H, estos son transferidos vía el grupo hemo-Fe al dominio Mo-Mpt (molibdeno-molibdopterina) donde normalmente se produce la reducción del nitrato a nitrito en una reacción de transferencia de 2 electrones. Alternativamente pueden sucederse dos transferencias de un solo  $e^-$  en el dominio Mo-MPT al nitrito para producir el radical libre NO. Tomada de Lamattina (2003)

Se ha descrito que la inhibición de la actividad NR por fosforilación tiene un correlato en la emisión de NO por parte de las hojas, ya que al bajar la actividad NR se reduce la emisión de NO (Lea y col., 2004). En nuestros experimentos la baja en los niveles de NO detectados en maíz coincide con una reducción de la actividad NR, y el incremento en la presencia de NO en soja coincide con un incremento de la actividad NR en dicha planta, permitiendo asumir que el cambio en la concentración de NO se podría deber, al menos en parte, al cambio en la actividad enzimática de la NR (Figura 4.33 y 4.35).

Es interesante mencionar también que un trabajo clave que ha relacionado la restricción de P y las respuestas morfológicas de aclimatación, con los elevados niveles de NO en raíces sugiere que el NO puede provenir al menos en parte de la actividad de la enzima xantina oxidoreductasa (XOR) (Wang 2010) indicando la participación de otro mecanismo dependiente de nitrito en la generación de NO frente a la deficiencia de P.

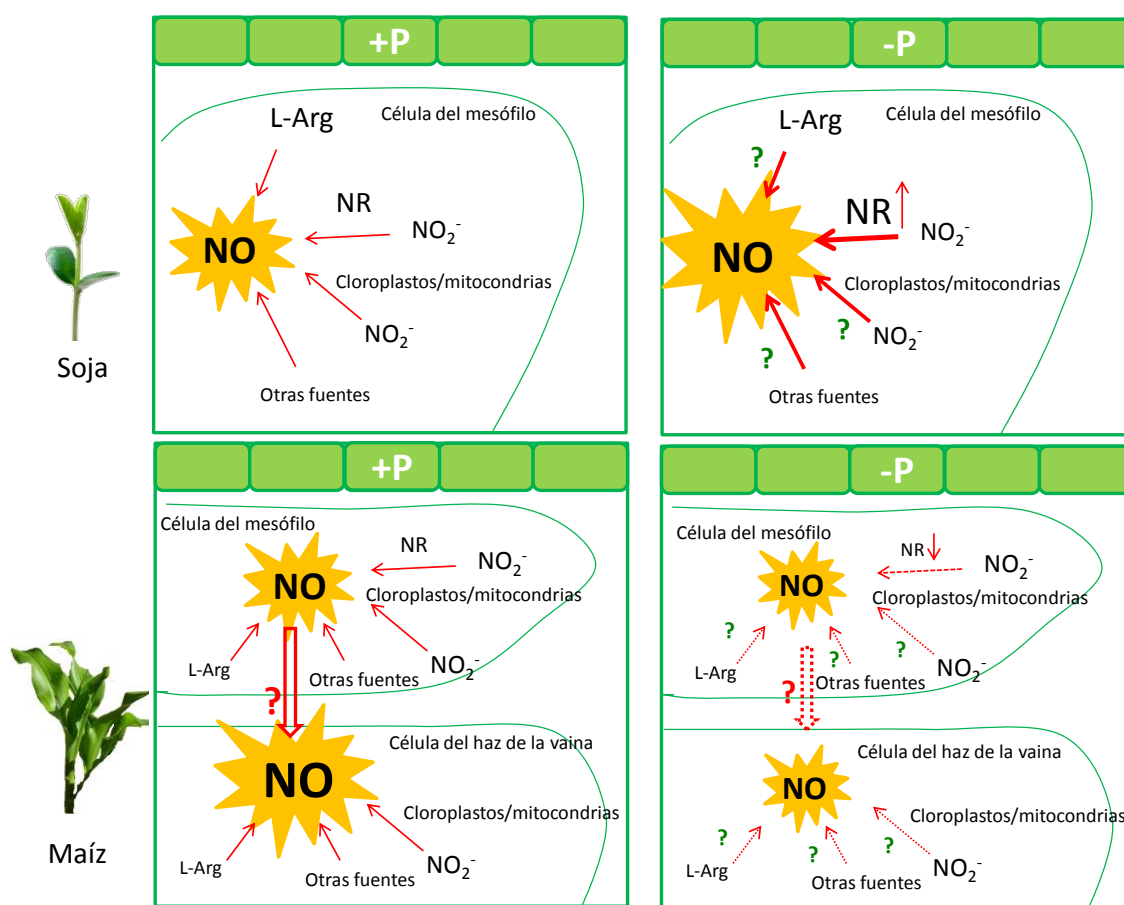
La generación de NO dependiente de la NR frente a condiciones de estrés abiótico ya ha sido descrita (Reda y col., 2018; Kolbert y col., 2010; Xie y col., 2013; Zhao y col., 2009), al igual el aumento en la actividad de NR frente a la deficiencia de P (Rabe y Lovatt, 1986). De esta forma es posible especular que el aumento de la actividad NR en las hojas de soja durante las primeras

horas de restricción de P puede estar causando el aumento de los niveles de NO, si bien no podemos descartar la participación de otras fuentes dependientes de nitrito o arginina como fue discutido anteriormente. En la soja, el incremento de la actividad NR podría ser explicado si se propone que la disminución en la concentración del P en el tejido podría favorecer la desfosforilación de la misma, y su consiguiente desinhibición. Sin embargo, la caída de P no parece ser tan dramática como para afectar los procesos de fosforilación de enzimas y además, una caída similar en las plantas de maíz no tuvo el mismo efecto, por lo tanto es posible sugerir que otros factores pueden estar afectando la actividad de la enzima en estas condiciones experimentales.

Ha sido descripto que la NR puede ser afectada por S-nitrosilación, modificando su funcionalidad. En segmentos de hojas expuestas a nitroprusiato de sodio (SNP) o GSNO, la actividad NR resultó reducida significativamente entre las 3 y 21 h de tratamiento, donde ni la expresión de la proteína ni la nitración de tirosinas resultaron afectadas por el SNP (Rosales y col., 2011). Sin embargo, cuando se estudió el efecto del tratamiento con poliaminas en la actividad NR, el cual resultó estar mediado por el NO, se observó una respuesta bifásica a lo largo del tratamiento, con una disminución a las 3 y 6 h de tratamiento (spermidina o spermina 0,1 mM) y un aumento a las 21 h (Rosales y col., 2012). Así los mecanismos que pueden regular la actividad de esta enzima parecen involucrar varios factores, desde la disponibilidad de P hasta uno de sus productos de reacción, el NO.

La NR en plantas C4 está restringida al citoplasma de las células del mesófilo (Vaughn y Campbell, 1988), de modo que la actividad NR registrada en la vaina equivale solo al 5% de la actividad observada en mesófilo, siendo esto consistente con la idea de que el grueso de la asimilación del nitrato ocurre en las células del mesofilo, y es posible que esa pequeña cantidad de NR en la vaina corresponda a contaminación desde el mesófilo durante la extracción (Neyra y Hageman, 1978). Todos los intentos realizados mediante aplicación de técnicas inductoras de la NR como luz o nitrato en filamentos aislados de células de la vaina fueron insatisfactorios (Neyra y Hageman, 1978), y posteriormente se pudo demostrar, por técnicas de inmunolocalización, que la NR se encuentra exclusivamente en el mesófilo de las plantas C4 (Vaughn y Campbell, 1988). La enzima nitrito reductasa (NiR) presenta una actividad 4-5 veces superior en el mesófilo en relación a la vaina, aunque en la vaina es una enzima constitutiva que probablemente procese el nitrito proveniente de una pequeña cantidad de NR en la misma vaina, el nitrito importado desde el mesófilo, o esté presente sin cumplir ningún rol fisiológico (Neyra y Hageman, 1978).

Por lo tanto, surge un interrogante interesante en torno a la generación de NO en plantas de maíz. Las imágenes de microscopía confocal parecen indicar una acumulación de NO en la zona de las células de la vaina en condiciones controles. Sin embargo también se puede observar co-localización de fluorescencia verde (correspondiente al DAF-FM) y a la clorofila (roja) en los cloroplastos del mesófilo. Los cloroplastos han sido propuestos como uno de los posibles sitios de generación de NO en las plantas (Arnaud y col., 2006; Foissner y col., 2000; Galatro y col., 2013; Jasid y col., 2006; Tewari y col., 2013). Por lo tanto es interesante investigar si el NO se produce en cloroplastos y se acumula en las células de la vaina o si alguna otra fuente de generación, por ejemplo dependiente de arginina puede ser operativa en estas células (Figura 5.2).



**Figura 5.2.** Esquema que muestra las diferencias observadas en relación con los niveles de NO en hojas de plantas de maíz y soja. Se proponen distintas fuentes de generación de esta especie en base a las descriptas en la literatura. Los signos de interrogación indican posibles modificaciones de estas vías, o de la acumulación/difusión, frente a la restricción de P. Dentro de “otras fuentes” se pueden incluir la generación dependiente de poliaminas, no enzimática a partir de nitrito, dependiente de la XOR en peroxisomas, entre otras.

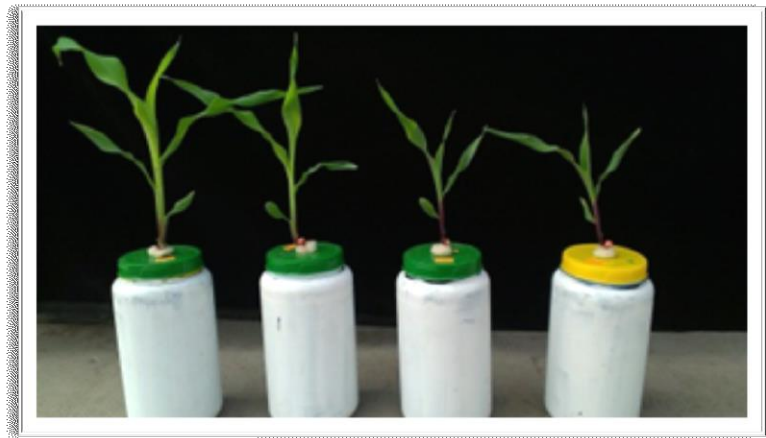


Ha sido descripto que en maíz, no sólo existen diferencias en la distribución de las enzimas que llevan a cabo la fotosíntesis entre las células del mesófilo y la vaina, sino que también se describieron diferencias en la distribución de antioxidantes (Doulis y col., 1997). Las enzimas glutatión reductasa y dehidroascorbato reductasa se encuentran exclusivamente en mesófilo, lo mismo sucede con la enzima antioxidante peroxiredoxina (Majeran y col., 2005), mientras que el ascorbato, la SOD y la APX son prácticamente indetectables en el mismo (Doulis y col. 1997). Esto es coincidente con el hecho que las enzimas que requieren NADPH se ubican en el mesófilo. En estos experimentos estaríamos observando un comportamiento similar en cuanto a una distribución diferencial del NO frente a un estrés nutricional, la restricción de P. De esta manera es posible pensar que la generación de NO también puede estar diferencialmente localizada en las hojas de maíz y que distintas fuentes puedan verse afectadas ante situaciones de estrés.

Así, este trabajo de tesis brinda una primera aproximación a la generación de NO en hojas de plantas de maíz, iniciando un campo de estudio en torno a la generación de NO en ambos tipos celulares, su acumulación y distribución. Futuros experimentos en torno a la síntesis de esta especie en ambos tipos de células y particularmente la posible participación de ambos tipos de cloroplastos (mesófilo y vaina) permitirán obtener una panorama más claro de las posibles vías de generación de NO en las células vegetales.

## 6. Conclusiones

---



## 6.1 Deficiencia de P en plantas de Maíz. Efecto de la exposición de las plantas a NO

- En esta tesis se caracterizó el rol desempeñado por el NO en algunas respuestas clásicas de las plantas de maíz al déficit de P. La adición de una fuente exógena de NO (GSNO) generó incrementos significativos en la capacidad de las raíces para acidificar el medio de cultivo, en la actividad de enzimas fosfatasas ácidas, y en la capacidad instantánea de las raíces para absorber P a partir de medios con muy baja concentración del nutriente. Así, se pudo evidenciar la participación de esta especie reactiva del nitrógeno en la modulación de ciertas respuestas al déficit de P previamente descriptas.
- Los tratamientos con GSNO como dador de NO sobre las plantas restringidas en P, no afectaron significativamente la acumulación de P, la distribución de biomasa, el contenido de antocianinas y el *filocrono*. La adición exógena de NO en la solución nutritiva durante los 21 días de deficiencia de P se tradujeron en una reducción en la eficiencia de utilización del P en la planta entera probablemente relacionada con la caída no estadísticamente significativa, pero observable, de la acumulación de biomasa tanto en raíz como en vástago de plantas en condición de déficit de P.
- La adición de GSNO a la solución nutritiva ayudó a mantener los valores de clorofila en hojas de plantas expuestas a déficit de P, lo cual podría explicarse mediante la existencia de un mecanismo de señalización a distancia que genere un efecto en las hojas a partir del tratamiento aplicado en las raíces. Sin embargo, la caída del rendimiento cuántico del fotosistema II ( $\Phi_{PSII}$ ) producto del déficit de P, no pudo revertirse por el tratamiento con NO exógeno probablemente debido a la inhibición de mecanismos del proceso fotosintético posteriores a la excitación lumínica de la clorofila, afectados por la baja disponibilidad de P.
- La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) en raíz no se vio significativamente afectada por el déficit de P, sin embargo, la actividad ascorbato peroxidasa (APX) se incrementó durante el mismo. El tratamiento con GSNO incrementó la actividad APX tanto en las plantas control como en las plantas sometidas a déficit de P, mientras que la actividad SOD fue significativamente reducida en ambas condiciones debido al tratamiento. Futuros estudios permitirán dilucidar si los cambios observados en este trabajo se deben a cambios en la expresión o en la actividad debido a modificaciones postraduccionales en las proteínas estudiadas.

- La actividad de las enzimas fosfatasas ácidas en la raíz se incrementó como consecuencia de la restricción de P, y resultó fuertemente influenciada por la presencia del dador de NO, que generó un incremento de la actividad únicamente bajo condiciones de déficit de P luego de un largo plazo (21 días) de tratamiento. Estos resultados permiten inferir que el efecto provocado por el NO requiere de una situación previa generada por la condición de déficit de P y sugiere un rol mediado por el NO dependiente del tiempo de tratamiento en esta respuesta de aclimatación a la deficiencia de P. Futuros estudios permitirán conocer si el aumento de la actividad enzimática generado a partir del agregado de NO en el medio de cultivo es causado por el efecto del mismo sobre la síntesis, la actividad, o el transporte de las enzimas.

- Las plantas de maíz expuestas durante 6 días a restricción de P generaron una fuerte caída en el pH de la solución nutritiva, habilidad que resultó incrementada de forma significativa en presencia del dador de NO. De esta forma se plantea que el fenómeno de acidificación del medio rizosférico podría estar relacionado con mecanismos específicos dependientes del NO que incrementan la extrusión de protones y/o ácidos orgánicos.

- El incremento en la capacidad de captar P a partir de soluciones diluidas se evidenció como una respuesta temprana al déficit, existiendo diferencias claramente significativas a los 6 días de tratamiento. El tratamiento con el dador de NO generó un incremento sobre la capacidad de captar P desde el medio externo en las plantas provenientes de una situación de déficit del mismo, lo cual podría ser atribuido principalmente a cambios en el influjo de P. Futuros estudios permitirán profundizar en torno a los mecanismos moleculares que relacionan al NO con esta respuesta, en particular en relación con los posibles transportadores de P involucrados en estos procesos.

- Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren una mejora en la capacidad de absorción de P como consecuencia de la exposición a NO en las plantas expuestas a déficit de P, mientras que por otro lado el tratamiento con NO redujo la EPU. Resultaría interesante llevar adelante experimentos con deficiencias moderadas de P para determinar si la habilidad de absorción de P modificada por el NO puede plasmarse en una mayor disponibilidad de P dentro de la planta, y si esta impacta en la EPU.

## 6.2 Deficiencia de P en plantas de soja. Efectos tempranos sobre el proteoma y el metabolismo del NO

- En este trabajo de tesis se combinaron técnicas fisiológicas y bioquímicas a fin de estimar los cambios fisiológicos y metabólicos tempranos desencadenados en las plantas de soja frente a las primeras horas de restricción de P, con un foco en los niveles de NO como un posible componente clave en la percepción y señalización de plantas enfrentando deficiencias nutricionales. Una aproximación *Shotgun* para evaluar los cambios en el proteoma en conjunto con el análisis de parámetros fisiológicos, la concentración de P en los tejidos, y los niveles de NO y ROS permitieron obtener un panorama global de los cambios desencadenados durante las primeras horas de restricción de P en las plantas de soja.

- Este análisis proteómico se desarrolló de manera conjunta con la evaluación de otros procesos fisiológicos, como el desempeño fotosintético, la concentración de P, y los niveles de especies activas del oxígeno (ROS) y nitrógeno (NO). Si bien ni los parámetros fotosintéticos ni el crecimiento fueron significativamente afectados, una caída inicial de la concentración total de P de 27% en las hojas unifoliadas luego de 24 h de restricción del nutriente llevaron a cambios en el proteoma y a modificaciones en los niveles de NO sugiriendo la existencia de cambios metabólicos tempranos inducidos durante las primeras horas de déficit.

-Luego de 24 h de restricción de P, el análisis proteómico dio como resultado un total de 202 proteínas exclusivamente expresadas y 232 proteínas incrementadas en las hojas. La clasificación de las proteínas de acuerdo al consorcio *Gene Ontology* por su función molecular o procesos biológicos reveló un mayor porcentaje perteneciente a la categoría de actividad catalítica o procesos metabólicos respectivamente.

- Los cambios en el proteoma sugieren que el metabolismo se prepara en forma temprana para enfrentar restricciones más severas en la disponibilidad de P, con cambios metabólicos que implican el ahorro de ATP y reciclado de P y la provisión de NADPH para procesos biosintéticos, el incremento en enzimas con capacidad antioxidante, del metabolismo de carbohidratos, e involucradas en metabolismo secundario, como por ejemplo en la síntesis de flavonoides, y en la síntesis de hormonas, como el etileno. Los cambios metabólicos relacionados al metabolismo de

carbohidratos y destinados a mantener el balance redox en la célula parecen ser claves durante las primeras horas de restricción de P.

- Bajo las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, tanto la actividad NR como los niveles de NO se vieron incrementados en condiciones de restricción de P. Adicionalmente, una isoforma de la NR fue exclusivamente expresada en las hojas de plantas sometidas a restricción de P. Los niveles de NO pueden ser consecuencia del incremento de la actividad NR, aunque otras posibles fuentes de generación de esta especie (que involucren arginina y poliaminas, u otras formas de reducir el nitrito) no pueden ser descartadas, y pueden contribuir también a la síntesis de NO en las hojas de soja bajo condiciones de restricción de P. Además, el incremento en la abundancia relativa de proteínas involucradas en la síntesis de etileno sugiere una posible interacción entre el NO y el metabolismo del etileno en hojas de soja pasadas las primeras 24 h de restricción de P.

-Aunque los niveles de NO se vieron incrementados bajo condiciones de restricción de P, el patrón de nitración de las proteínas no resultó sustancialmente modificado en las hojas, sugiriendo que esta modificación es un proceso específico y cuidadosamente regulado y reforzando la idea que el rendimiento del proceso de nitración biológica es bajo debido a la multiplicidad de factores que involucran tanto al proceso de nitración en sí mismo y las especies que participan, como a los mecanismos de reparación y metabolismo de la 3-nitrotirosina. La mayoría de las proteínas nitradas en las hojas de soja en ambas condiciones experimentales tienen localización cloroplástica, uno de los sitios propuestos de generación de NO y ROS. Sólo una proteína resultó diferencialmente nitrada, la metionina sintasa, siendo el significado funcional de esta modificación *in planta* blanco de futuros estudios.

- Las plantas de soja parecen percibir la baja disponibilidad de P en forma temprana, y los cambios desencadenados sugieren el ajuste de su metabolismo para afrontar condiciones más severas de restricción al nutriente. La actividad NR y la generación de NO podrían ser mecanismos involucrados en la percepción y respuesta temprana al estrés. Futuros estudios focalizados en señalización relacionados a la interacción NO-hormonas, como el etileno, podrían proveer información acerca de los mecanismos involucrados en estas respuestas como ser por ejemplo las modificaciones postraduccionales por nitración o nitrosilación de proteínas.

### 6.3 Deficiencia de P en plantas de maíz y soja. Análisis comparativo de las respuestas tempranas a la restricción de P

- Las plantas de soja y maíz presentan diferencias en la forma y lugar donde se desarrolla la fotosíntesis, cada una con un metabolismo energético característico y una morfología asociada al mismo. En este contexto resultó interesante evaluar comparativamente las respuestas tempranas frente a la restricción de P, según el tipo de metabolismo (C3 o C4). Frente caídas comparables en la concentración del P celular se observaron cambios en las respuestas de las plantas en relación con los niveles y localización del NO en las células.

- El decaimiento significativo y similar en la concentración de P a tiempos cortos de restricción (24 h) en plantas de maíz y soja (hoja unifoliada en plantas de soja, hoja 2 en plantas de maíz), no impactó en los parámetros fotosintéticos ( $\Phi_{PSII}$  y concentración de clorofila) ni en otros parámetros fisiológicos como la conductancia estomática, los cuales permanecieron estables para ambas especies. Una posible interpretación sería que la disminución en la concentración de P evaluado en la hoja completa podría estar reflejando la caída de la concentración en la vacuola, mientras los valores citoplasmáticos se mantienen en un rango fisiológico garantizando el normal funcionamiento del aparato fotosintético y otras funciones fisiológicas.

- El nivel de NO en las hojas afectadas por la restricción de P resultó distinto para ambas especies, ya que las hojas unifoliadas de soja (C3), incrementaron significativamente el nivel de NO, mientras que las hojas del maíz (C4) no sólo no lo incrementaron, sino que mostraron una tendencia a disminuir el nivel de esta especie principalmente en las células de la vaina. Las diferencias observadas para las plantas de maíz y soja coincidieron con los cambios observados en la actividad de la enzima NR permitiendo asumir que el cambio en la concentración de NO se podría deber, al menos en parte, al cambio en la actividad enzimática de la NR. Como la caída del P no parece ser tan dramática como para afectar los procesos de fosforilación de enzimas es posible sugerir que otros factores de regulación pueden estar afectando la actividad de la enzima en estas condiciones experimentales.

- La acumulación de NO en células de la vaina y en los cloroplastos del mesófilo en las plantas de maíz arroja interrogantes interesantes en torno a la producción de NO en ambos tipos celulares,

ya sea que el NO se produzca en cloroplastos y se acumule en las células de la vaina o que alguna otra fuente de generación, por ejemplo dependiente de arginina pueda ser operativa en estas células. De esta manera es posible proponer que la generación de NO también puede estar diferencialmente localizada las hojas de maíz y que las distintas fuentes puedan verse afectadas ante situaciones de estrés, como ocurre por ejemplo con otras enzimas y antioxidantes. Futuros experimentos en torno a la generación y las vías de degradación de NO en ambos tipos de células permitirán obtener una panorámica más clara de las posibles vías de generación de NO involucradas.

**Los resultados obtenidos permiten proponer al NO como modulador de respuestas claves de aclimatación frente a la restricción de P. Los cambios tempranos en los niveles de NO sugieren una participación de esta molécula en la percepción de las modificaciones producidas en el ambiente.**

**Si bien los mecanismos involucrados tanto en la generación de esta especie como en la participación de la misma en la modulación de las respuestas necesitan ser investigados, este trabajo de Tesis ha permitido avanzar en el conocimiento de las funciones del NO en las plantas particularmente sometidas a déficit nutricional.**



## Referencias bibliográficas

---

## 7. Referencias bibliográficas

- Abbona, Esteban Andrés, Miriam Presutti, Mabel Vázquez y Santiago Javier Sarandón. 2016. Los Sistemas de Producción de Carne y Leche Bovina En La Provincia de Buenos Aires ¿conservan Los Nutrientes Del Suelo?. *Revista de La Facultad de Agronomía UNLP*. 115 (2): 251–63.
- Agati, Giovanni, Elisa Azzarello, Susanna Pollastri y Massimiliano Tattini. 2012. Flavonoids as Antioxidants in Plants: Location and Functional Significance. *Plant Science* 196: 67–76.
- Arnaud, N, I Murgia, J Boucherez, and JF Briat. 2006. An Iron-Induced Nitric Oxide Burst Precedes Ubiquitin-Dependent Protein Degradation for Arabidopsis AtFer1 Ferritin Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry* 281 (33): 23579–88.
- Asada K. 2006. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology* 141 (2): 391–96.
- Asher Loneragan. 1967. Response of Plants to Phosphate Concentration in Solution Culture: I. Growth and Phosphorus Content. *Soil Science* 103 (4): 225–33.
- Ashida Hiroki, Yohtaro Saito, Chojiro Kojima, y Akiho Yokota. 2008. Enzymatic Characterization of 5-Methylthioribulose-1-Phosphate Dehydratase of the Methionine Salvage Pathway in *Bacillus Subtilis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 72 (4): 959–67.
- Astier, J, I Gross y J Durner. 2017. Nitric Oxide Production in Plants: An Update. *Journal of Experimental Botany* 69 (14): 3401–11.
- Astier Jérémy, Sumaira Rasul, Emmanuel Koen, Hamid Manzoor, Angélique Besson-Bard, Olivier Lamotte, Sylvain Jeandroz, Jörg Durner, Christian Lindermayr y David Wendehenne. 2011. S-Nitrosylation: An Emerging Post-Translational Protein Modification in Plants. *Plant Science* 181 (5): 527–33.
- Baker, Alison, S. Antony Ceasar, Antony J. Palmer, Jaimie B. Paterson, Wanjun Qi, Stephen P. Muench, y Stephen A. Baldwin. 2015. Replace, Reuse, Recycle: Improving the Sustainable Use of Phosphorus by Plants. *Journal of Experimental Botany*. 66 (12): 3523-3540.
- Barber, SA. 1995. Soil Nutrient Bioavailability: A Mechanistic Approach. John Wiley and sons, New Jersey, 384pp.

- Batjes, N. H. 1997. A World Dataset of Derived Soil Properties by FAO/UNESCO Soil Unit for Global Modelling. *Soil Use and Management* 13 (1): 9–16.
- Beauchamp C y Fridovich I. 1971. Superoxide Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* 44 (1): 276–87.
- Beligni María Verónica y Lorenzo Lamattina. 1999. Nitric Oxide Counteracts Cytotoxic Processes Mediated by Reactive Oxygen Species in Plant Tissues. *Planta* 208 (3): 337–44.
- Beligni MV y Lamattina L. 2000. Nitric Oxide Stimulates Seed Germination and De-Etiolation, and Inhibits Hypocotyl Elongation, Three Light-Inducible Responses in Plants. *Planta* 210 (2): 215–21.
- Bethke PC, Badger MR y Jones RL. 2004. Apoplastic Synthesis of Nitric Oxide by Plant Tissues. *The Plant Cell* 16 (2): 332–41.
- Bolland Mike y Robert Gilkes. 1998. The Chemistry and Agronomic Effectiveness of Phosphate Fertilizers. *Journal of Crop Production* 1 (2): 139–63.
- Bowsher CG, Long DM, Oaks A y Rothstein SJ. 1991. Effect of Light/Dark Cycles on Expression of Nitrate Assimilatory Genes in Maize Shoots and Roots. *Plant Physiology* 95 (1): 281–85.
- Bozzo G, Vinay KS y Plaxton W. 2004. Phosphate or Phosphite Addition Promotes the Proteolytic Turnover of Phosphate-Starvation Inducible Tomato Purple Acid Phosphatase Isozymes. *FEBS Letters* 573 (1–3): 51–54.
- Bradford M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1–2): 248–54.
- Bradshaw AD, Chadwick MJ, Jowett D y Lodge RW. 1960. Experimental Investigations into the Mineral Nutrition of Several Grass Species: Part III. Phosphate Level. *The Journal of Ecology*, 631–37.
- Bright J, Desikan R, Hancock JT y Neill SJ. 2006. ABA-induced NO Generation and Stomatal Closure in Arabidopsis Are Dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Synthesis. *The Plant Journal* 45 (1): 113–22.
- Buet A, Moriconi JI, Santa-María GE y Simontacchi M. 2014. An Exogenous Source of Nitric Oxide

- Modulates Zinc Nutritional Status in Wheat Plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 83: 337–45.
- Buet A y Simontacchi M. 2015. Nitric Oxide and Plant Iron Homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1340 (1): 39–46.
- Cakmak I, Hengeler C y Marschner H. 1994. Partitioning of Shoot and Root Dry Matter and Carbohydrates in Bean Plants Suffering from Phosphorus, Potassium and Magnesium Deficiency. *Journal of Experimental Botany* 45 (9): 1245–50.
- Calderon-Vazquez, C., R. J. H. Sawers, and L. Herrera-Estrella. 2011. “Phosphate Deprivation in Maize: Genetics and Genomics.” *Plant Physiology* 156 (3): 1067–77.  
<https://doi.org/10.1104/pp.111.174987>.
- Calderon-Vazquez C, Ibarra-Laclette E, Caballero-Perez J y Herrera-Estrella L. 2008. Transcript Profiling of Zea Mays Roots Reveals Gene Responses to Phosphate Deficiency at the Plant- and Species-Specific Levels. *Journal of Experimental Botany* 59 (9): 2479–97.
- Carstensen A, Herdean A y Schmidt SB. 2018. The Impacts of Phosphorus Deficiency on the Photosynthetic Electron Transport Chain. *Plant Physiology* 177 (1): 271–84.
- Carvalho PC, Fischer JS, Xu T, Cociorva D, Balbuena TS, Valente RH, Perales J, Yates JR y Barbosa VC. 2012a. Search Engine Processor: Filtering and Organizing Peptide Spectrum Matches. *Proteomics* 12 (7): 944–49.
- Carvalho PC, Fischer JS, Xu T, Yates JR y Barbosa VC. 2012b. PatternLab: From Mass Spectra to Label-Free Differential Shotgun Proteomics. *Current Protocols in Bioinformatics*, 13–19. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV y Santos MDM. 2016. Integrated Analysis of Shotgun Proteomic Data with PatternLab for Proteomics 4.0. *Nature Protocols* 11 (1): 102.
- Carvalho PC, Yates JR y Barbosa BC. 2012c. Improving the TFC Test for Differential Shotgun Proteomics.” *Bioinformatics* 28 (12): 1652–54.
- Castrillo G, Teixeira PJPL, Paredes SH, Law TF. 2017. Root Microbiota Drive Direct Integration of Phosphate Stress and Immunity. *Nature*, 543(7646): 513

- Cecconi D, Orzetti S, Vandelle E y Rinalducci S. 2009. Protein Nitration during Defense Response in *Arabidopsis Thaliana*. *Electrophoresis* 30 (14): 2460–68.
- Chaki M y Valderrama R. 2009. Protein Targets of Tyrosine Nitration in Sunflower (*Helianthus Annuus* L.) Hypocotyls. *Journal of Experimental Botany* 60 (15): 4221–34.
- Chamizo-Ampudia A, Galvan A y Fernandez E. 2017. Study of Different Variants of Mo Enzyme CrARC and the Interaction with Its Partners CrCytb5-R and CrCytb5-1. *International Journal of Molecular Sciences* 18 (3): 670.
- Chamizo-Ampudia A, Sanz-Luque E y Llamas A. 2017. Nitrate Reductase Regulates Plant Nitric Oxide Homeostasis. *Trends in Plant Science* 22 (2): 163–74.
- Chamizo-Ampudia A, Sanz-Luque E, Llamas A, Ocaña-Calahorra F, Mariscal V, Carreras A, Barroso JB, Galván A y Fernández E. 2016. A Dual System Formed by the ARC and NR Molybdoenzymes Mediates Nitrite-Dependent NO Production in *Chlamydomonas*. *Plant, Cell & Environment* 39 (10): 2097–2107.
- Christie EK. 1975. Physiological Responses of Semiarid Grasses. II. The Pattern of Root Growth in Relation to External Phosphorus Concentration. *Australian Journal of Agricultural Research* 26 (3): 437–46.
- Clark RB. 1975. Characterization of Phosphatase of Intact Maize Roots. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 23 (3): 458–60.
- Cogliatti DH y Clarkson DT. 1983. Physiological Changes in, and Phosphate Uptake by Potato Plants during Development of, and Recovery from Phosphate Deficiency. *Physiologia Plantarum* 58 (3): 287–94.
- Cogliatti DH y Santa-Maria GES. 1990. Influx and Efflux of Phosphorus in Roots of Wheat Plants in Non-Growth-Limiting Concentrations of Phosphorus. *Journal of Experimental Botany* 41 (5): 601–7.
- Colombini M. 2012. VDAC Structure, Selectivity, and Dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta* 1818 (6): 1457–65.
- Cordell D, Drangert JO y White S. 2009. The Story of Phosphorus: Global Food Security and Food

- for Thought. *Global environmental change*, 2009, vol. 19, no 2, p. 292-305
- Cordell D y White S. 2015. Tracking Phosphorus Security: Indicators of Phosphorus Vulnerability in the Global Food System. *Food Security* 7 (2): 337–50.
- Corpas FJ y Barroso JB. 2017. Nitric Oxide Synthase-like Activity in Higher Plants. *Nitric Oxide* 68: 5–6.
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Valderrama R, Palma JM, León AM, Sandalio LM y del Río LA. 2006. Constitutive Arginine-Dependent Nitric Oxide Synthase Activity in Different Organs of Pea Seedlings during Plant Development. *Planta* 224 (2): 246–54.
- Correa-Aragunde N, Foresi N y Lamattina L. 2015. Nitric Oxide Is a Ubiquitous Signal for Maintaining Redox Balance in Plant Cells: Regulation of Ascorbate Peroxidase as a Case Study. *Journal of Experimental Botany* 66 (10): 2913–21.
- Cruzate GA y Casas R. 2009. Extracción de Nutrientes En La Agricultura Argentina. Accessed September 25, 2018. [http://www.ipni.net/publication/ia-lacs.nsf/0/D0F05E377CB382B68525799500757379/\\$FILE/21.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-lacs.nsf/0/D0F05E377CB382B68525799500757379/$FILE/21.pdf).
- Cruzate GA y Casas R. 2012. Extracción y Balance de Nutrientes En Los Suelos Agrícolas de La Argentina. *Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica*. (6): 7-14.
- Darrah, PR 1993. The Rhizosphere and Plant Nutrition: A Quantitative Approach. *Plant and Soil* 155–156 (1): 1–20.
- Deane-Drummond CE y Clarkson DT. 1979. Effect of Shoot Removal and Malate on the Activity of Nitrate Reductase Assayed in Vivo in Barley Roots (*Hordeum Vulgare* Cv. Midas). *Plant Physiology* 64 (4): 660–62.
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA y Lamb C. 1998. Nitric Oxide Functions as a Signal in Plant Disease Resistance. *Nature* 394 (6693): 585.
- Demicheli V, Quijano C, Alvarez B y Radi R. 2007. Inactivation and Nitration of Human Superoxide Dismutase (SOD) by Fluxes of Nitric Oxide and Superoxide. *Free Radical Biology and Medicine* 42 (9): 1359–68.
- Dong B, Ryan PR, Rengel Z y Delhaize E. 1999. Phosphate Uptake in *Arabidopsis Thaliana*:

- Dependence of Uptake on the Expression of Transporter Genes and Internal Phosphate Concentrations. *Plant, Cell and Environment* 22 (11): 1455–61.
- Doulis AG, Debian N, Kingston-Smith AH y Foyer CH. 1997. Differential Localization of Antioxidants in Maize Leaves. *Plant Physiology* 114 (3): 1031–37.
- Du ST, Liu Y, Zhang P, Liu HJ, Zhang XQ y Zhang RR. 2015. Atmospheric Application of Trace Amounts of Nitric Oxide Enhances Tolerance to Salt Stress and Improves Nutritional Quality in Spinach (*Spinacia Oleracea* L.). *Food Chemistry* 173 (April): 905–11.
- Duan E, Wang Y, Liu L, Zhu J, Zhong M, Zhang H y Li S. 2016. Pyrophosphate: Fructose-6-Phosphate 1-Phosphotransferase (PFP) Regulates Carbon Metabolism during Grain Filling in Rice. *Plant Cell Reports* 35 (6): 1321–31.
- Ederli L, Morettini R, Borgogni A y Wasternack C. 2006. Interaction between Nitric Oxide and Ethylene in the Induction of Alternative Oxidase in Ozone-Treated Tobacco Plants. *Plant Physiology* 142 (2): 595–608.
- Ellsworth DS, Crous KY, Lambers H y Cooke J. 2015. Phosphorus Recycling in Photorespiration Maintains High Photosynthetic Capacity in Woody Species. *Plant, Cell & Environment* 38 (6): 1142–56.
- Fan M, Bai R, Zhao X y Zhang J. 2007. Aerenchyma Formed Under Phosphorus Deficiency Contributes to the Reduced Root Hydraulic Conductivity in Maize Roots. *Journal of Integrative Plant Biology* 49 (5): 598–604.
- Fitter AH y Hay RKM. 1985. Functional Significance of Root Morphology and Root System Architecture. *Ecological Interaction in Soil Plant Microbes and Animals*, 87–106.
- Föhse D, Claassen N y Jungk A. 1988. Phosphorus Efficiency of Plants. *Plant and Soil* 110 (1): 101–9.
- Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C y Durner J. 2000. In Vivo Imaging of an Elicitor-Induced Nitric Oxide Burst in Tobacco. *The Plant Journal* 23 (6): 817–24.
- Foresi N, Correa-Aragunde N, Parisi G y Caló G. 2010. Characterization of a Nitric Oxide Synthase from the Plant Kingdom: NO Generation from the Green Alga *Ostreococcus Tauri* Is Light Irradiance and Growth Phase. *The Plant Cell* 22 (11): 3816.

- Foresi N, Mayta ML, Lodeyro AF, Scuffi D, Correa-Aragunde N, García-Mata C, Casalengué C, Carrillo N y Lamattina L. 2015. Expression of the Tetrahydrofolate-Dependent Nitric Oxide Synthase from the Green Alga *Ostreococcus Tauri* Increases Tolerance to Abiotic Stresses and Influences Stomatal Development in Arabidopsis. *The Plant Journal* 82 (5): 806–21.
- Foyer CH y Noctor G. 2005. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *The Plant Cell* 17 (7): 1866–75.
- Freschi L. 2013. Nitric Oxide and Phytohormone Interactions: Current Status and Perspectives. *Frontiers in Plant Science* 4 (398).
- Fröhlich A y Durner J. 2011. The Hunt for Plant Nitric Oxide Synthase (NOS): Is One Really Needed?. *Plant Science* 181 (4): 401–4.
- Furchgott RF y Zawadzki JV. 1980. The Obligatory Role of Endothelial Cells in the Relaxation of Arterial Smooth Muscle by Acetylcholine. *Nature* 288 (5789): 373.
- Galatro A, Puntarulo S y Guamet JJ. 2013. Chloroplast Functionality Has a Positive Effect on Nitric Oxide Level in Soybean Cotyledons. *Plant Physiology and Biochemistry* 66: 26–33.
- Gao W, Lu L, Qiu W y Wang C. 2017. OsPAP26 Encodes a Major Purple Acid Phosphatase and Regulates Phosphate Remobilization in Rice. *Plant and Cell Physiology* 58 (5): 885–92.
- García-Mata C y Lamattina L. 2002. Nitric Oxide and Abscissic Acid Cross Talk in Guard Cells. *Plant Physiology* 128 (3): 790–92.
- García-Mata C y Lamattina L. 2001. Nitric Oxide Induces Stomatal Closure and Enhances the Adaptive Plant Responses against Drought Stress. *Plant Physiology* 126 (3): 1196–1204.
- Gas E., Flores-Perez U, Sauret-Gueto S y Rodriguez-Concepcion M. 2009. Hunting for Plant Nitric Oxide Synthase Provides New Evidence of a Central Role for Plastids in Nitric Oxide Metabolism. *The Plant Cell Online* 21 (1): 18–23.
- Gaume A, Mächler F, León CD, Narro L y Frossard E. 2001. Low-P Tolerance by Maize (*Zea Mays* L.) Genotypes: Significance of Root Growth, and Organic Acids and Acid Phosphatase Root Exudation. *Plant and Soil* 228 (2): 253–64.
- Gerke J. 2015. The Acquisition of Phosphate by Higher Plants: Effect of Carboxylate Release by the



- Roots. A Critical Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 178 (3): 351–64.
- Gilbert N. 2009. The Disappearing Nutrient. *Nature News*, 461(7265), 716-718.
- Godber BLJ, Doel JJ, Sapkota GP y Blake DR. 2000. Reduction of Nitrite to Nitric Oxide Catalyzed by Xanthine Oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry* 275 (11): 7757–63.
- González-Muñoz E, Avendaño-Vázquez AO, Montes RA, de Folter S, Andrés-Hernández L, Abreu-Goodger L y Sawers RJ. 2015. The Maize (*Zea Mays* Ssp. *Mays* Var. B73) Genome Encodes 33 Members of the Purple Acid Phosphatase Family. *Frontiers in Plant Science* 6 (May): 341.
- Graziano M, Beligni MV y Lamattina L. 2002. Nitric Oxide Improves Internal Iron Availability in Plants. *Plant Physiology* 130 (4): 1852–59.
- Gu M, Chen A, Sun S y Xu G. 2016. Complex Regulation of Plant Phosphate Transporters and the Gap between Molecular Mechanisms and Practical Application: What Is Missing?. *Molecular Plant* 9 (3): 396–416.
- Guo FQ, y Crawford NM. 2005. Arabidopsis Nitric Oxide Synthase1 Is Targeted to Mitochondria and Protects against Oxidative Damage and Dark-Induced Senescence. *The Plant Cell* 17 (12): 3436–50.
- Gupta KJ y Werner MK. 2010. Production and Scavenging of Nitric Oxide by Barley Root Mitochondria. *Plant and Cell Physiology* 51 (4): 576–84.
- Gupta KJ, Stoimenova M y Kaiser WM. 2005. In Higher Plants, Only Root Mitochondria, but Not Leaf Mitochondria Reduce Nitrite to NO, in Vitro and in Situ. *Journal of Experimental Botany* 56 (420): 2601–9.
- Gupta KJ, Fernie AR, Kaiser WM y van Dongen JT. 2011. On the Origins of Nitric Oxide. *Trends in Plant Science* 16 (3): 160–68.
- Hammond JP, Broadley MR y White PJ. 2004. Genetic Responses to Phosphorus Deficiency. *Annals of Botany* 94 (3): 323–32.
- Harrison MJ. 2005. Signaling in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Annual Review of Microbiology* 59 (1): 19–42.

- Hatch MD y Osmond CB. 1976. Compartmentation and Transport in C4 Photosynthesis. In *Transport in Plants III*, 144–84.
- Heldt HW, Chon CJ, Maronde D, Herold A, Stankovic ZS, Walker DA, Kraminer A, Kirk MR y Heber U. 1977. Role of Orthophosphate and Other Factors in the Regulation of Starch Formation in Leaves and Isolated Chloroplasts. *Plant Physiology* 59 (6): 1146–55.
- Hermans C, Hammond JP y White PJ. 2006. How Do Plants Respond to Nutrient Shortage by Biomass Allocation?. *Trends in Plant Science* 11 (12): 610–17.
- Hernández I y Munné-Bosch S. 2015. Linking Phosphorus Availability with Photo-Oxidative Stress in Plants. *Journal of Experimental Botany* 66 (10): 2889–2900.
- Hill JO, Simpson RJ, Moore AD, Chapman DF. 2006. Morphology and Response of Roots of Pasture Species to Phosphorus and Nitrogen Nutrition. *Plant and Soil* 286 (1–2): 7.
- Hinsinger P. 2001. Bioavailability of Soil Inorganic P in the Rhizosphere as Affected by Root-Induced Chemical Changes: A Review. *Plant and Soil* 237 (2): 173–95.
- Hocking PJ. 2001. Organic Acids Exuded from Roots in Phosphorus Uptake and Aluminum Tolerance of Plants in Acid Soils. *Advances in Agronomy* 74: 64–99.
- Hoff T, Stummann BM y Henningsen KW. 1992. Structure, Function and Regulation of Nitrate Reductase in Higher Plants. *Physiologia Plantarum* 84 (4): 616–24.
- Holzmeiste C, Gaupels F, Geerlof A, Sarioglu H, Sattler M, Durner J y Lindermayr C. 2014. *Differential inhibition of Arabidopsis superoxide dismutases by peroxynitrite-mediated tyrosine nitration*. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 989–999.
- Huang X, Stettmaier K, Michel C, Hutzler P y Mueller MJ. 2004. Nitric Oxide Is Induced by Wounding and Influences Jasmonic Acid Signaling in Arabidopsis Thaliana. *Planta* 218 (6): 938–46.
- Huber JL, Redinbaugh MG, Huber SC y Campbell WH. 1994. Regulation of Maize Leaf Nitrate Reductase Activity Involves Both Gene Expression and Protein Phosphorylation. *Plant Physiology* 106 (4): 1667–74.
- Huber JL, Huber SC y Campbell WH. 1992. Reversible Light/Dark Modulation of Spinach Leaf

- Nitrate Reductase Activity Involves Protein Phosphorylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 296 (1): 58–65.
- Ignarro LJ, Cirino G y Casini A. 1999. Nitric Oxide as a Signaling Molecule in the Vascular System: An Overview. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 34 (6): 879–86.
- Inskeep WP y Bloom PR. 1985. Extinction Coefficients of Chlorophyll a and b in N, N-Dimethylformamide and 80% Acetone. *Plant Physiology* 77 (2): 483–85.
- Itoh S y Barber SA. 1983. Phosphorus Uptake by Six Plant Species as Related to Root Hairs 1. *Agronomy Journal* 75 (3): 457–61.
- Jasid S, Galatro A, Villordo JJ, Puntarulo S y Simontacchi M. 2009. Role of Nitric Oxide in Soybean Cotyledon Senescence. *Plant Science* 176 (5): 662–68.
- Jasid S, Simontacchi M, Bartoli CG y Puntarulo S. 2006. Chloroplasts as a Nitric Oxide Cellular Source. Effect of Reactive Nitrogen Species on Chloroplastic Lipids and Proteins. *Plant Physiology* 142 (3): 1246–55.
- Jeandroz S, Wipf D, Stuehr DJ, Lamattina L, Melkonian M, Tian Z, Zhu Y, Carpenter EJ, Wong GK y Wendehenne D. 2016. Occurrence, Structure, and Evolution of Nitric Oxide Synthase-like Proteins in the Plant Kingdom. *Science Signaling* 9 (417): re2-re2.
- Kaiser WM y Brendle-Behnisch E. 1991. Rapid Modulation of Spinach Leaf Nitrate Reductase Activity by Photosynthesis : I. Modulation in Vivo by CO<sub>2</sub> Availability. *Plant Physiology* 96 (2): 363–67.
- Kang J, Park J, Choi H, Burla B, Kretschmar T, Lee Y y Martinoia E. 2011. Plant ABC Transporters. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists* 9: 25.
- Keyster M, Klein A, Egbich I, Jacobs A y Ludidi N. 2011. Nitric Oxide Increases the Enzymatic Activity of Three Ascorbate Peroxidase Isoforms in Soybean Root Nodules. *Plant Signaling & Behavior* 6 (7): 956–61.
- Kleinman PJA, Sharpley AN, McDowell RW, Flaten DN, Buda AR, Tao L, Bergstrom L y Zhu Q. 2011. Managing Agricultural Phosphorus for Water Quality Protection: Principles for Progress. *Plant and Soil*. 349(1-2), 169-182.

- Klepper L. 1979. Nitric Oxide (NO) and Nitrogen Dioxide (NO<sub>2</sub>) Emissions from Herbicide-Treated Soybean Plants. *Atmospheric Environment* 13 (4): 537–42.
- Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K y Urano Y. 1998. Direct Evidence of NO Production in Rat Hippocampus and Cortex Using a New Fluorescent Indicator: DAF-2 DA. *Neuroreport* 9 (15): 3345–48.
- Kolbert z, Ortega L y Erdei L. 2010. Involvement of Nitrate Reductase (NR) in Osmotic Stress-Induced NO Generation of Arabidopsis Thaliana L. Roots. *Journal of Plant Physiology* 167 (1): 77–80.
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano y Pagnussat M. 2003. Nitric Oxide: The Versatility of an Extensive Signal Molecule. *Annual Review of Plant Biology* 54 (1): 109–36.
- Lambers H, Cawthray GR, Giavalisco P, Kuo J, Laliberté E, Pearse SJ, Scheible WR, Stitt , Teste F y Turner BL. 2012. Proteaceae from Severely Phosphorus-Impoverished Soils Extensively Replace Phospholipids with Galactolipids and Sulfolipids during Leaf Development to Achieve a High Photosynthetic Phosphorus-Use-Efficiency. *New Phytologist* 196 (4): 1098–1108.
- Lambers H, Mougel C, Jaillard B y Hinsinger P. 2009. Plant-Microbe-Soil Interactions in the Rhizosphere: An Evolutionary Perspective. *Plant and Soil* 321 (1–2): 83–115.
- Laspina NV, Groppa MD, Tomaro ML y Benavides MP. 2005. Nitric Oxide Protects Sunflower Leaves against Cd-Induced Oxidative Stress. *Plant Science* 169 (2): 323–30.
- Laxalt AM, Beligni MV y Lamattina L. 1997. Nitric Oxide Preserves the Level of Chlorophyll in Potato Leaves Infected by Phytophthora Infestans. *European Journal of Plant Pathology* 103 (7): 643–51.
- Lea US, Hoopen FT, Provan F, Kaiser WM, Meyer C y Lillo C. 2004. Mutation of the Regulatory Phosphorylation Site of Tobacco Nitrate Reductase Results in High Nitrite Excretion and NO Emission from Leaf and Root Tissue. *Planta* 219 (1): 59–65.
- Leach J, Keyster M, Du Plessis M y Ludidi N. 2010. Nitric Oxide Synthase Activity Is Required for Development of Functional Nodules in Soybean. *Journal of Plant Physiology* 167 (18): 1584–91.

- Lee RB, Ratcliffe RG y Southon TE. 1990.  $^{31}\text{P}$  NMR Measurements of the Cytoplasmic and Vacuolar Pi Content of Mature Maize Roots: Relationships with Phosphorus Status and Phosphate Fluxes. *Journal of Experimental Botany* 41 (9): 1063–78.
- Lei M, Zhu C, Liu Y, Karthikeyan AS, Bressan RA, Raghothama KG y Liu D. 2011. Ethylene Signalling Is Involved in Regulation of Phosphate Starvation-Induced Gene Expression and Production of Acid Phosphatases and Anthocyanin in Arabidopsis. *New Phytologist* 189 (4): 1084–95.
- Leshem YY y Haramaty E. 1996. The Characterization and Contrasting Effects of the Nitric Oxide Free Radical in Vegetative Stress and Senescence of *Pisum Sativum* Linn. Foliage. *Journal of Plant Physiology* 148 (3–4): 258–63.
- Leshem, YY y Wills RBH. 1998. Harnessing Senescence Delaying Gases Nitric Oxide and Nitrous Oxide: A Novel Approach to Postharvest Control of Fresh Horticultural Produce. *Biologia Plantarum* 41 (1): 1–10.
- Li C, Gui S, Yang T, Walk T, Wang X y Liao H. 2012. Identification of Soybean Purple Acid Phosphatase Genes and Their Expression Responses to Phosphorus Availability and Symbiosis. *Annals of Botany* 109 (1): 275–85.
- Libourel IGL, Bethke PC, De Michele R y Jones RL. 2006. Nitric Oxide Gas Stimulates Germination of Dormant Arabidopsis Seeds: Use of a Flow-through Apparatus for Delivery of Nitric Oxide. *Planta* 223 (4): 813–20.
- Lillo C, Meyer C, Lea US, Provan F y Olteidal S. 2004. Mechanism and Importance of Post-Translational Regulation of Nitrate Reductase. *Journal of Experimental Botany* 55 (401): 1275–82.
- Lillo C, Lea US, Leydecker MT y Meyer C. 2003. Mutation of the Regulatory Phosphorylation Site of Tobacco Nitrate Reductase Results in Constitutive Activation of the Enzyme *in Vivo* and Nitrite Accumulation. *The Plant Journal* 35 (5): 566–73.
- Lindermayr C, Saalbach G y Durner J. 2005. Proteomic Identification of S-Nitrosylated Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* 137 (3): 921–30.
- Lindsay WL. 1980. Chemical Equilibria in Soils. *Clays and Clay Minerals*. John Wiley and Sons Ltd.

- Liu F y Guo FQ. 2013. Nitric Oxide Deficiency Accelerates Chlorophyll Breakdown and Stability Loss of Thylakoid Membranes during Dark-Induced Leaf Senescence in Arabidopsis. *PLoS ONE* 8 (2): e56345.
- Liu H, Sadygov RG y Yates JR. 2004. A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics. *Analytical Chemistry* 76 (14): 4193–4201.
- Liu WZ, Kong DD, Gu XX, Gao HB, Wang JZ y Hu Y. 2013. Cytokinins Can Act as Suppressors of Nitric Oxide in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (4): 1548–53.
- Liu X, Liu Q, Gupta E, Zorko N, Brownlee E y Zweier JL. 2005. Quantitative Measurements of NO Reaction Kinetics with a Clark-Type Electrode. *Nitric Oxide* 13 (1): 68–77.
- Lopez-Hernandez D y Siebert G. 1986. Competitive Adsorption of Phosphate with Malate and Oxalate by Tropical Soils 1. *Soil Science Society of America Journal* 50 (6): 1460–62.
- Lozano-Juste J y Colom-Moreno R. 2011. In Vivo Protein Tyrosine Nitration in Arabidopsis Thaliana. *Journal of Experimental Botany* 62 (10): 3501–17.
- Lozano-Juste J y León J. 2011. Nitric Oxide Regulates DELLA Content and PIF Expression to Promote Photomorphogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* 156 (3): 1410–23.
- Lv DW, Zhu GR, Zhu D, Bian YW y Liang XN. 2016. Proteomic and Phosphoproteomic Analysis Reveals the Response and Defense Mechanism in Leaves of Diploid Wheat T. Monococcum under Salt Stress And. *Journal of Proteomics* 143: 93–105.
- Lynch JP y Ho MD (2005). Rhizoeconomics: carbon costs of phosphorus acquisition. *Plant and Soil*, 269(1-2), 45-56.
- Ma Z, Bielenberg DG, Brown KM y Lynch JP. 2001. Regulation of Root Hair Density by Phosphorus Availability in Arabidopsis Thaliana. *Plant, Cell and Environment* 24 (4): 459–67.
- MacDonald GK, Bennett EM, Potter PA y Ramankutty N. 2011. Agronomic Phosphorus Imbalances across the World's Croplands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108 (7), 3086-3091.
- MacKintosh C y Meek SEM. 2001. Regulation of Plant NR Activity by Reversible Phosphorylation, 14-3-3 Proteins and Proteolysis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58 (2): 205–14.

- Majeran W, Cai Y, Sun Q y van Wijk KJ. 2005. Functional Differentiation of Bundle Sheath and Mesophyll Maize Chloroplasts Determined by Comparative Proteomics. *The Plant Cell* 17 (11): 3111–40.
- Martinez A, Peluffo G, Petruk AA, Hugo M, Piñeyro D, Demicheli V y Moreno DM. 2014. Structural and Molecular Basis of the Peroxynitrite-Mediated Nitration and Inactivation of *Trypanosoma Cruzi* Iron-Superoxide Dismutases (Fe-SODs) A and B. *Journal of Biological Chemistry* 289 (18): 12760–78.
- Martinez DE y Guimett JJ. 2004. Distortion of the SPAD 502 Chlorophyll Meter Readings by Changes in Irradiance and Leaf Water Status. *Agronomie*, 24(1), 41-46
- McLaughlin MJ y James TR. 1991. Effect of Phosphorus Supply to the Surface Roots of Wheat on Root Extension and Rhizosphere Chemistry in an Acidic Subsoil. *Plant-Soil Interactions at Low PH*. Springer. Dordrecht. 205–214.
- McNeill AM y Penfold CM. 2009. Agronomic Management Options for Phosphorus in Australian Dryland Organic and Low-Input Cropping Systems. *Crop and Pasture Science* 60 (2): 163.
- Meng ZB, Chen LQ, Suo D, Li GX y Tang CX. 2012. Nitric Oxide Is the Shared Signalling Molecule in Phosphorus- and Iron-Deficiency-Induced Formation of Cluster Roots in White Lupin (*Lupinus Albus*). *Annals of Botany* 109 (6): 1055–64.
- Mi H, Huang X, Muruganujan A y Tang H. 2016. PANTHER Version 11: Expanded Annotation Data from Gene Ontology and Reactome Pathways, and Data Analysis Tool Enhancements. *Nucleic Acids Research*. 45 (1): 183–89.
- Mirzaei M, Soltani N, Sarhadi E, Pascovici D, Keighley T, Salekdeh GH, Haynes PA y Atwell BJ. 2012. Shotgun Proteomic Analysis of Long-Distance Drought Signaling in Rice Roots. *Journal of Proteome Research* 11 (1): 348–58.
- Mishina TE, Lamb C y Zeier J. 2007. Expression of a Nitric Oxide Degrading Enzyme Induces a Senescence Programme in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment* 30 (1): 39–52.
- Miyazaki JH y Yang SF. 1987. The Methionine Salvage Pathway in Relation to Ethylene and Polyamine Biosynthesis. *Physiologia Plantarum* 69 (2): 366–70.

- Mollier A y Pellerin S. 1999. Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. *Journal of Experimental Botany*, 50(333), 487-497.
- Moran R y Porath D. 1980. Chlorophyll Determination in Intact Tissues Using N, N-Dimethylformamide. *Plant Physiology* 65 (3): 478–79.
- Moreau M, Lindermayr C, Durner J y Klessig DF. 2010. NO Synthesis and Signaling in Plants - Where Do We Stand?. *Physiologia Plantarum* 138 (4): 372–383.
- Moriconi JI y Santa-María GE. 2013. A Theoretical Framework to Study Potassium Utilization Efficiency in Response to Withdrawal of Potassium. *Journal of Experimental Botany* 64 (14): 4289–4299.
- Mur LAJ, Mandon J, Persijn S y Cristescu SM. 2013. Nitric Oxide in Plants: An Assessment of the Current State of Knowledge. *AoB* 5. 5, pls052-pls052.
- Mur LAJ, Prats E, Pierre S, Hall MA y Hebelstrup KH. 2013. Integrating Nitric Oxide into Salicylic Acid and Jasmonic Acid/ Ethylene Plant Defense Pathways. *Frontiers in Plant Science* 4: 215.
- Murphy J y Riley JP. 1962. A Modified Single Solution Method for the Determination of Phosphate in Natural Waters. *Analytica Chimica Acta* 27: 31–36.
- Neumann G y Römheld V. 1999. Root Excretion of Carboxylic Acids and Protons in Phosphorus-Deficient Plants. *Plant and Soil* 211 (1): 121–30.
- Neyra CA y Hageman RH. 1978. Pathway for Nitrate Assimilation in Corn (Zea Mays L.) Leaves: Cellular Distribution of Enzymes and Energy Sources for Nitrate Reduction. *Plant Physiology* 62 (4): 618–21.
- Nicolaou A, Kenyon SH, Gibbons JM, Ast T y Gibbons WA. 1996. In Vitro Inactivation of Mammalian Methionine Synthase by Nitric Oxide. *European Journal of Clinical Investigation* 26 (2): 167–70.
- Niu YF, Chai RS, Jin GL, Wang H y Tang CX. 2012. Responses of Root Architecture Development to Low Phosphorus Availability: A Review. *Annals of Botany* 112 (2): 391–408.
- Noritake T, Kawakita K y Doke N. 1996. Nitric Oxide Induces Phytoalexin Accumulation in Potato Tuber Tissues. *Plant and Cell Physiology* 37 (1): 113–16.



- Oehl F, Oberson A, Tagmann HU, Besson JM. 2002. Phosphorus Budget and Phosphorus Availability in Soils under Organic and Conventional Farming. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 2002, vol. 62, no 1, p. 25-35.
- Ortega-Galisteo AP, Rodríguez-Serrano M, Pazmiño DM, Gupta, DK, Sandalio LM y Romero-Puertas MC. 2012. *S-Nitrosylated proteins in pea (Pisum sativum L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. Journal of Experimental Botany*, 63(5), 2089–2103.
- Pagnussat GC, Lanteri ML y Lamattina L. 2003. Nitric Oxide and Cyclic GMP Are Messengers in the Indole Acetic Acid-Induced Adventitious Rooting Process. *Plant Physiology* 132 (3): 1241–48.
- Pagnussat GC, Lanteri ML, Lombardo MC y Lamattina L. 2004. Nitric Oxide Mediates the Indole Acetic Acid Induction Activation of a Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Involved in Adventitious Root Development. *Plant Physiology* 135 (1): 279–286.
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S y Lamattina L. 2002. Nitric Oxide Is Required for Root Organogenesis. *Plant Physiology* 129 (3): 954–956.
- Panorama Agrícola Semanal, 2018, Bolsa de Cereales de Buenos Aires. Último acceso: Septiembre de 2018. <http://www.bolsadecereales.com/pas>.
- Peng ZF, Chen MJ, Yap YW y Manikandan J. 2008. Proteasome Inhibition: An Early or Late Event in Nitric Oxide-Induced Neuronal Death?. *Nitric Oxide* 18 (2): 136–145.
- Plaxton WC y Tran HT. 2011. Metabolic Adaptations of Phosphate-Starved Plants." *Plant Physiology* 156 (3): 1006–1015.
- Pourcel L, Routaboul JM, Cheynier V y Lepiniec L. 2007. Flavonoid Oxidation in Plants: From Biochemical Properties to Physiological Functions. *Trends in Plant Science* 12 (1): 29–36.
- Puga MI, Rojas-Triana M, de Lorenzo L y Leyva A. 2017. Novel Signals in the Regulation of Pi Starvation Responses in Plants: Facts and Promises. *Current Opinion in Plant Biology* 39: 40–49.
- Kitson RE y Mellon MG. 1944. Colorimetric Determination of Phosphorus as Molybdivanadophosphoric Acid. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 16(6), 379-383.

- Rabe E y Lovatt CJ. 1986. Increased Arginine Biosynthesis during Phosphorus Deficiency: A Response to the Increased Ammonia Content of Leaves. *Plant Physiology* 81 (3): 774–779.
- Radi R. 2004. Nitric Oxide, Oxidants, and Protein Tyrosine Nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (12): 4003–8.
- Raghothama KG. 1999. Phosphate Acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50 (1): 665–693.
- Raghothama KG. 2000. Phosphate transport and signaling. *Current opinion in plant biology*, 3(3), 182-187.
- Raghothama KG y Karthikeyan AS. 2005. Phosphate Acquisition. *Plant and Soil* 274 (1–2): 37–49.
- Ramaekers L, Remans R, Rao IM, Blair MW y Vanderleyden J. 2010. Strategies for Improving Phosphorus Acquisition Efficiency of Crop Plants. *Field Crops Research*. 117(2-3), 169-176.
- Reda M, Golicka A, Kabała K Y Janicka M. 2018. Involvement of NR and PM-NR in NO Biosynthesis in Cucumber Plants Subjected to Salt Stress. *Plant Science* 267: 55–64.
- Richardson AE. 2009. Regulating the Phosphorus Nutrition of Plants: Molecular Biology Meeting Agronomic Needs. *Plant and Soil*. 322(1-2), 17-24.
- Rockel P, Strube f, Rockel A Y Wildt J. 2002. Regulation of Nitric Oxide (NO) Production by Plant Nitrate Reductase in Vivo and in Vitro. *Journal of Experimental Botany* 53 (366): 103–10.
- Romero-Puertas MC, Perazzolli M, Zago ED y Delledonne M. 2004. Nitric Oxide Signalling Functions in Plant-Pathogen Interactions. *Cellular Microbiology* 6 (9): 795–803.
- Rosales EP, Iannone MF, Groppa MD y Benavides MP. 2012. Polyamines Modulate Nitrate Reductase Activity in Wheat Leaves: Involvement of Nitric Oxide. *Amino Acids* 42 (2–3): 857–865.
- Rosales EP, Iannone MF y Groppa MD. 2011. Nitric Oxide Inhibits Nitrate Reductase Activity in Wheat Leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 49 (2): 124–30.
- Rose TJ, Liu L y Wissuwa M. 2013. Improving Phosphorus Efficiency in Cereal Crops: Is Breeding for Reduced Grain Phosphorus Concentration Part of the Solution?. *Frontiers in Plant Science* 4:

404.

- Rose T J, Mori A, Julia CC y Wissuwa M. 2016. Screening for Internal Phosphorus Utilisation Efficiency: Comparison of Genotypes at Equal Shoot P Content Is Critical. *Plant and Soil* 401 (1–2): 79–91.
- Rose TJ, Rose MT, Pariasca-Tanaka J, Heuer S y Wissuwa M. 2011. The Frustration with Utilization: Why Have Improvements in Internal Phosphorus Utilization Efficiency in Crops Remained so Elusive? *Frontiers in Plant Science* 2: 73.
- Rose TJ y Wissuwa M. 2012. Rethinking Internal Phosphorus Utilization Efficiency: A New Approach Is Needed to Improve PUE in Grain Crops. *Advances in Agronomy* 116: 185–217.
- Royo B, Moran JF Y Ratcliffe RG. 2015. Nitric Oxide Induces the Alternative Oxidase Pathway in Arabidopsis Seedlings Deprived of Inorganic Phosphate. *Journal of Experimental Botany* 66 (20): 6273–80.
- Rufty TW, Israel DW, Volk RJ y Qiu JS. 1993. Phosphate Regulation of Nitrate Assimilation in Soybean. *Journal of Experimental Botany* 44 (5): 879–91.
- Rümer S, Gupta KJ y Kaiser WM. 2009. Plant Cells Oxidize Hydroxylamines to NO. *Journal of Experimental Botany* 60 (7): 2065–72.
- Santa-Cruz DM, Pacienza NA y Zilli CG. 2014. Nitric Oxide Induces Specific Isoforms of Antioxidant Enzymes in Soybean Leaves Subjected to Enhanced Ultraviolet-B Radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 141: 202–9.
- Santa-María GE y Moriconi JI. 2015. Internal Efficiency of Nutrient Utilization: What Is It and How to Measure It during Vegetative Plant Growth?. *Journal of Experimental Botany* 66 (11): 3011–18.
- Santolini J, André F, Jeandroz S y Wendehenne D. 2017. Nitric Oxide Synthase in Plants: Where Do We Stand?. *Nitric Oxide* 63: 30–38.
- Sarandón SJ, Zuluaga MS, Cieza R, Janjetic L. 2006. Evaluación de La Sustentabilidad de Sistemas Agrícolas de Fincas En Misiones, Argentina, Mediante El Uso de Indicadores. *Agroecología*, 1, 19-28.

- Schachtman DP, Reid RJ y Ayling SM. 1998. Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiology* 116 (2): 447–53.
- Sha A, Li M, Yang P. 2016. Identification of Phosphorus Deficiency Responsive Proteins in a High Phosphorus Acquisition Soybean (Glycine Max) Cultivar through Proteomic Analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1864 (5): 427–34.
- Shane MW, Stigter K, Fedosejevs ET y Plaxton WC. 2014. Senescence-Inducible Cell Wall and Intracellular Purple Acid Phosphatases: Implications for Phosphorus Remobilization in *Hakea Prostrata* (Proteaceae) and *Arabidopsis Thaliana* (Brassicaceae). *Journal of Experimental Botany* 65 (20): 6097–6106.
- Shen H, Chen J, Wang Z y Yang C. 2006. Root Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Is Involved in the Adaptation of Soybean to Phosphorus Starvation. *Journal of Experimental Botany* 57 (6): 1353–62.
- Shen J, Yuan L, Zhang J, Li H, Bai Z, Chen X, Zhang W y Zhang F. 2011. Phosphorus Dynamics: From Soil to Plant. *Plant Physiology* 156 (3): 997–1005.
- Shin R, Berg RH y Schachtman DP. 2005. Reactive Oxygen Species and Root Hairs in *Arabidopsis* Root Response to Nitrogen, Phosphorus and Potassium Deficiency. *Plant and Cell Physiology* 46 (8): 1350–1357.
- Simontacchi M, García-Mata C, Bartoli CG, Santa-María GE y Lamattina L. 2013. Nitric Oxide as a Key Component in Hormone-Regulated Processes. *Plant Cell Reports* 32 (6): 853–66.
- Simontacchi M, Buet A, Lamattina L y Puntarulo S. 2012. Exposure to Nitric Oxide Increases the Nitrosyl-Iron Complexes Content in *Sorghum* Embryonic Axes. *Plant Science* 183: 159–66.
- Simontacchi M, Galatro A, Ramos-Artuso F y Santa-María GE. 2015. Plant Survival in a Changing Environment: The Role of Nitric Oxide in Plant Responses to Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Science* 6: 977.
- Simontacchi M, Jasid S y Puntarulo S. 2004. Nitric Oxide Generation during Early Germination of *Sorghum* Seeds. *Plant Science* 167 (4): 839–47.
- Singh HP, Kaur S, Batish DR, Sharma VP y Sharma N. 2009. Nitric Oxide Alleviates Arsenic Toxicity

- by Reducing Oxidative Damage in the Roots of *Oryza Sativa* (Rice). *Nitric Oxide* 20 (4): 289–97.
- Singh SP, Wishnok JS y Keshive M. 1996. The Chemistry of the S-Nitrosoglutathione/Glutathione System. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (25): 14428–33.
- Smith FW, Hawkesford MJ y Rae AL. 2000. Molecular Mechanisms of Phosphate and Sulphate Transport in Plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465 (1–2): 236–45.
- Stöhr C, Strube F, Marx G, Ullrich WR y Rockel P. 2001. A Plasma Membrane-Bound Enzyme of Tobacco Roots Catalyses the Formation of Nitric Oxide from Nitrite. *Planta* 212 (5–6): 835–41.
- Stöhr C y Ullrich WR. 1997. A Succinate-Oxidising Nitrate Reductase Is Located at the Plasma Membrane of Plant Roots. *Planta* 203 (1): 129–32.
- Stuehr DJ. 1999. Mammalian Nitric Oxide Synthases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411 (2–3): 217–30.
- Sun B, Jing Y, Chen K, Song L y Chen L. 2007. Protective Effect of Nitric Oxide on Iron Deficiency-Induced Oxidative Stress in Maize (*Zea Mays*). *Journal of Plant Physiology* 164 (5): 536–43.
- Suzuki N, Sakuta M, Shimizu S y Komamine A. 1995. Changes in the Activity of 3-Deoxy-D-Arabinose-7-Phosphate (DAHP) Synthase in Suspension-Cultured Cells of *Vitis*. *Physiologia Plantarum* 94 (4): 591–96.
- Tadano T, Ozawa K, Sakai H, Osaki M y Matsui H. 1993. Secretion of Acid Phosphatase by the Roots of Crop Plants under Phosphorus-Deficient Conditions and Some Properties of the Enzyme Secreted by Lupin Roots. *Plant Nutrition*, 99–102. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Taiz L, y Zeiger E. 2002. “Plant Physiology.” *Annals of Botany*.
- Georgia T, Filippou P, Belghazi M, Job D, Diamantidis G, Fotopoulos V y Molassiotis A. 2012. Oxidative and Nitrosative-Based Signaling and Associated Post-Translational Modifications Orchestrate the Acclimation of Citrus Plants to Salinity Stress. *The Plant Journal* 72 (4): 585–99.
- Terrile MC, París R, Calderón-Villalobos LIA, Iglesias MJ, Lamattina L, Estelle M y Casalengué CA.

2012. Nitric Oxide Influences Auxin Signaling through S-Nitrosylation of the Arabidopsis TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 Auxin Receptor. *The Plant Journal* 70 (3): 492–500.
- Tewari RK, Prommer J y Watanabe M. 2013. Endogenous Nitric Oxide Generation in Protoplast Chloroplasts. *Plant Cell Reports* 32 (1): 31–44.
- Tewari, RK, Kumar P, Tewari N y Srivastava S. 2004. Macronutrient Deficiencies and Differential Antioxidant Responses—influence on the Activity and Expression of Superoxide Dismutase in Maize. *Plant Science* 163 (3): 687–94.
- Thomas DD, Liu X, Kantrow SP y Lancaster JR. 2001. The Biological Lifetime of Nitric Oxide: Implications for the Perivascular Dynamics of NO and O<sub>2</sub>. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (1): 355–60.
- Tran HT y Plaxton WC. 2008. Proteomic Analysis of Alterations in the Secretome of Arabidopsis Thaliana Suspension Cells Subjected to Nutritional Phosphate Deficiency.” *Proteomics* 8 (20): 4317–26.
- Tran HT, Qian W, Hurley BA, She YM, Wang D y Plaxton WC. 2010. Biochemical and Molecular Characterization of AtPAP12 and AtPAP26: The Predominant Purple Acid Phosphatase Isozymes Secreted by Phosphate-Starved Arabidopsis Thaliana. *Plant, Cell & Environment* 33 (11): 1789–1803.
- Tun NN, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh ELS y Scherer GFE. 2006. Polyamines Induce Rapid Biosynthesis of Nitric Oxide (NO) in Arabidopsis Thaliana Seedlings. *Plant and Cell Physiology* 47 (3): 346–354.
- Tyburski J, Dunajska K y Tretyn A. 2009. Reactive Oxygen Species Localization in Roots of Arabidopsis Thaliana Seedlings Grown under Phosphate Deficiency. *Plant Growth Regulation* 59 (1): 27–36.
- Ullah S, Kolo Z, Egbichi I, Keyster M y Ludidi N. 2016. Nitric Oxide Influences Glycine Betaine Content and Ascorbate Peroxidase Activity in Maize. *South African Journal of Botany* 105: 218–25.
- Vance CP, Uhde-Stone C y Allan DL. 2003. Phosphorus Acquisition and Use: Critical Adaptations by Plants for Securing a Nonrenewable Resource. *New Phytologist* 157 (3): 423–47.

- Vaughn KC y Campbell WH. 1988. Immunogold Localization of Nitrate Reductase in Maize Leaves. *Plant Physiology* 88 (4): 1354–57.
- Veljanovski V, Vanderbeld B y Knowles VL. 2006. Biochemical and Molecular Characterization of AtPAP26, a Vacuolar Purple Acid Phosphatase up-Regulated in Phosphate-Deprived Arabidopsis Suspension Cells And. *Plant Physiology* 142 (3): 1282–93.
- Veneklaas EJ, Lambers H, Bragg J, Finnegan PM, Lovelock CE, Plaxton WC y Price CA. 2012. Opportunities for Improving Phosphorus-Use Efficiency in Crop Plants. *New Phytologist* 195 (2): 306–20.
- Wang BL, Tang XY, Cheng LY, Zhang AZ, Zhang WH, Zhang FS y Liu JQ. 2010. Nitric Oxide Is Involved in Phosphorus Deficiency-Induced Cluster-Root Development and Citrate Exudation in White Lupin. *New Phytologist* 187 (4): 1112–23.
- Wang D, Sulian LV, Jiang P y Li X. 2017. Roles, Regulation, and Agricultural Application of Plant Phosphate Transporters. *Frontiers in Plant Science* 8 (May): 817.
- Wang YL, Almvik M, Clarke N, Eich-Greatorex S, Øgaard AF, Krogstad T, Lambers H y Clarke JL. 2015. Contrasting Responses of Root Morphology and Root-Exuded Organic Acids to Low Phosphorus Availability in Three Important Food Crops with Divergent Root Traits. *AoB Plants* 7: plv097.
- Wenhao Y, Ying Y, Wang C, Zhao Y, Dong C, Whelan J y Shou H. 2017. OsNLA1, a RING-Type Ubiquitin Ligase, Maintains Phosphate Homeostasis in *Oryza Sativa* via Degradation of Phosphate Transporters. *The Plant Journal* 90 (6): 1040–51.
- Wu AP, Gong L, Chen X y Wang JX. 2014. Interactions between Nitric Oxide, Gibberellic Acid, and Phosphorus Regulate Primary Root Growth in Arabidopsis. *Biologia Plantarum* 58 (2): 335–40.
- Xie Y, Mao Y, Lai D, Zhang W, Zheng T y Shen W. 2013. Roles of NIA/NR/NOA1-Dependent Nitric Oxide Production and HY1 Expression in the Modulation of Arabidopsis Salt Tolerance. *Journal of Experimental Botany* 64 (10): 3045–60.
- Yamasaki H y Cohen M. 2006. NO Signal at the Crossroads: Polyamine-Induced Nitric Oxide Synthesis in Plants?. *Trends in Plant Science* 11 (11): 522–24.

- Yan F, Zhu Y, Müller C, Zörb C y Schubert S. 2002. Adaptation of H<sup>+</sup>-Pumping and Plasma Membrane H<sup>+</sup> ATPase Activity in Proteoid Roots of White Lupin under Phosphate Deficiency. *Plant Physiology* 129 (1): 50–63.
- Yan N, Zhang YL, Xue HM, Zhang XH, Wang ZD, Shi LY y Guo DP. 2015. Changes in Plant Growth and Photosynthetic Performance of *Zizania Latifolia* Exposed to Different Phosphorus Concentrations under Hydroponic Condition. *Photosynthetica* 53 (4): 630–35.
- Yao QL, Yang KC, Pan GT y Rong TZ. 2007. The Effects of Low Phosphorus Stress on Morphological and Physiological Characteristics of Maize (*Zea Mays* L.) Landraces. *Agricultural Sciences in China* 6 (5): 559–66.
- Zandonadi DB, Santos MP, Dobbss LB, Olivares FL, Canellas LP, Binzel ML, Okorokova-Façanha AL y Façanha AR. 2010. Nitric Oxide Mediates Humic Acids-Induced Root Development and Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Activation. *Planta* 231 (5): 1025–36.
- Zeeman SC, Thorneycroft D y Schupp N. 2004. Plastidial  $\alpha$ -Glucan Phosphorylase Is Not Required for Starch Degradation in Arabidopsis Leaves but Has a Role in the Tolerance of Abiotic Stress. *Plant Physiology* 135 (2): 849–58.
- Zhang K, Liu H, Tao P y Chen H. 2014. Comparative Proteomic Analyses Provide New Insights into Low Phosphorus Stress Responses in Maize Leaves. *Beemster. PLoS ONE* 9 (5): e98215.
- Zhang L, Wang Y, Zhao L y Shi S. 2006. Involvement of Nitric Oxide in Light-Mediated Greening of Barley Seedlings. *Journal of Plant Physiology* 163 (8): 818–26.
- Zhang Z, Liao H y Lucas WJ. 2014. Molecular Mechanisms Underlying Phosphate Sensing, Signaling, and Adaptation in Plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 56 (3): 192–220.
- Zhao L, Zhang F, Guo J, Yang Y, Li B y Zhang L. 2004. Nitric Oxide Functions as a Signal in Salt Resistance in the Calluses from Two Ecotypes of Reed. *Plant Physiology* 134 (2): 849–57.
- Zhao M, Tian GQY y Zhang WH. 2007. Nitric Oxide Synthase-Dependent Nitric Oxide Production Is Associated with Salt Tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology* 144 (1): 206–17.
- Zhao MG, Chen L, Zhang LL y Zhang WH. 2009. Nitric Reductase-Dependent Nitric Oxide Production Is Involved in Cold Acclimation and Freezing Tolerance in Arabidopsis. *Plant*



*Physiology* 151 (2): 755–67.

Zhu CQ, Zhu XF, Hu AY, Wang C y Wang B. 2016. Differential Effects of Nitrogen Forms on Cell Wall Phosphorus Remobilization in Rice (*Oryza Sativa*) Are Mediated by Nitric Oxide, Pectin Content and the Expression of The. *Plant Physiology* 171 (2): 1407–17.

Zhu XF, Zhu CQ, Wang C, Dong XY. 2017. Nitric Oxide Acts Upstream of Ethylene in Cell Wall Phosphorus Reutilization in Phosphorus-Deficient Rice. *Journal of Experimental Botany* 68 (3): 753–60.